

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle**  
Bureau international



**(43) Date de la publication internationale**  
**10 janvier 2002 (10.01.2002)**

**PCT**

**(10) Numéro de publication internationale**  
**WO 02/02811 A2**

- (51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C12Q 1/68,  
1/70**
- (21) Numéro de la demande internationale :**  
**PCT/FR01/02191**
- (22) Date de dépôt international :** 6 juillet 2001 (06.07.2001)
- (25) Langue de dépôt :** français
- (26) Langue de publication :** français
- (30) Données relatives à la priorité :**  
00/08839 6 juillet 2000 (06.07.2000) FR
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :** BIO MERIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy L'Etoile (FR).
- (72) Inventeurs; et**
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :** RENAUD, Patricia [FR/FR]; 21 bis, rue Victor Hugo, Résidence Les Cascades, F-78230 Le Pecq (FR). GUILLOT, Emmanuelne [FR/FR]; 23 bis rue, de Turville, F-78100 Saint Germain en Laye (FR). MABILAT, Claude [FR/FR]; 5, rue du Manoir, F-69650 Saint Germain au Mont d'Or (FR). VACHON, Carole [FR/FR]; 37 bis rus, Descartes, F-69100 Villeurbanne (FR). LACROIX, Bruno [FR/FR]; 93, Route de Vourles, F-69230 Saint Genis Laval (FR). VERNET, Guy [FR/FR]; Montée du Vieux Château, F-69250 Albigny sur Saone (FR). ARMAND, Marie-Astrid [FR/FR]; 4, impasse Van Gogh, F-38230 Charvieu Chavagneux (FR). LAFFAIRE, Philippe [FR/FR]; 5, impasse des Courlis, F-38230 Tigieu Jameyzieu (FR).
- (74) Mandataire :** DIDIER, Mireille; Cabinet Germain & Maureau, Boîte postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (FR).
- (81) États désignés (national) :** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) États désignés (régional) :** brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publiée :**

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

[Suite sur la page suivante]

**(54) Title: METHOD FOR CONTROLLING THE MICROBIOLOGICAL QUALITY OF AN AQUEOUS MEDIUM AND KIT THEREFOR**

**(54) Titre : PROCEDE DE CONTROLE DE LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE D'UN MILIEU AQUEUX ET NECESSAIRE APPROPRIE**

**(57) Abstract:** The invention concerns a method for controlling the microbiological quality of an environmental aqueous medium, suspected of containing various micro-organisms, comprising the following steps: selecting a reference set, consisting of at least three micro-organisms, representing jointly or separately, a microbiological quality level; providing a microbiological detection kit, consisting of at least three probes specifically and respectively identifying said three micro-organisms; after treating the medium to be analysed, contacting said micro-organisms, or any fraction thereof derived from the medium to be analysed therefrom, with said detection kit, whereby a multiple determination of said micro-organisms is carried out, said determination representing the microbiological quality level of the medium. The invention also concerns an appropriate microbiological detection kit for implementing said method.

**(57) Abrégé :** Procédé de contrôle de la qualité microbiologique d'un milieu aqueux environnemental, susceptible de comporter différents micro-organismes, comprenant les étapes suivantes: on choisit un ensemble de référence, constitué d'au moins trois micro-organismes, représentatifs, ensemble ou séparément, d'un niveau de qualité microbiologique, on dispose d'un nécessaire de détermination microbiologique, constitué d'au moins trois sondes d'identification spécifiquement et respectivement desdits trois microorganismes, après traitement du milieu à analyser, on met lesdits microorganismes, ou toute fraction obtenue à partir de ces derniers, en contact avec ledit nécessaire de détermination, moyennant quoi on multi-détermine lesdits microorganismes, cette détermination étant représentative du niveau de qualité microbiologique du milieu. Nécessaire de détermination microbiologique approprié pour la mise en oeuvre du procédé de l'invention.

A2

WO 02/02811



WO 02/02811 A2



- avec la partie réservée au listage des séquences de la description publiée séparément sous forme électronique et disponible sur demande auprès du Bureau international

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

## PROCEDE DE CONTRÔLE DE LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE D'UN MILIEU AQUEUX ET NECESSAIRE APPROPRIE

La présente invention relève du domaine du diagnostic microbiologique, des techniques de détection permettant l'identification et la quantification de microorganismes présents dans des fluides et produits comme par exemple les eaux.

Elle concerne également des nécessaires de dosage et des procédés, permettant ces identifications et quantifications de microorganismes sur des échantillons de volumes importants, en des temps inférieurs à la 10 journée, et permettant éventuellement un contrôle en suivi de production, voire un asservissement des techniques de purification et de production aux résultats de ces dosages.

Les méthodes classiques d'identification microbiologique requièrent une étape de culture sur milieux sélectifs suivie en général d'une identification, 15 selon des caractéristiques morphologiques, biochimiques, et/ou immunologiques.

Ces méthodes sont longues, un jour à plusieurs semaines pour des bactéries à croissance lente, par exemple 10 à 12 jours pour *Legionella*, jusqu'à un mois pour les Mycobactéries, peu spécifiques, et peu sensibles 20 quand elles sont appliquées à un échantillon complexe polymicrobien (eau, environnement, aliments). De plus, elles ne permettent pas de détecter les bactéries viables non cultivables (VBNC) stressées par des facteurs environnementaux ou des traitements de désinfection, et ne se prêtent pas à l'automatisation.

25 Depuis plus de dix ans, les méthodes de biologie moléculaire, en particulier celles basées sur l'amplification enzymatique *in vitro* (PCR) et l'utilisation de sondes oligonucléotidiques ont révolutionné le diagnostic microbiologique.

Grâce à leur rapidité, sensibilité et spécificité, elles constituent une 30 alternative aux méthodes classiques pour détecter en particulier des microorganismes indicateurs ou pathogènes dans des échantillons d'eau ou tout échantillon, permettant de détecter la présence de tels microorganismes dans l'environnement.

Parmi les méthodes de biologie moléculaire utilisées pour détecter 35 en particulier des microorganismes indicateurs ou pathogènes dans des échantillons d'eau ou tout échantillon, permettant de détecter la présence de

·tels microorganismes dans l'environnement, on peut citer notamment les suivantes.

Pour la détection des indicateurs de contamination fécale (coliformes totaux, thermotolérants, *E coli*) usuellement recherchés dans le 5 contrôle sanitaire de l'eau, des tests rapides basés sur une PCR-hybridation avec une sonde ont été développés pour des échantillons d'eau potable notamment [Bej, A.K. et al. Appl. Environ. Microbiol, 1990, n° 56, p. 307-314] [Fricker, E.J. et al., Letters in Applied Microbiology, 1994, n° 19, p. 44-46].

Ces indicateurs de contamination fécale ne permettent cependant 10 pas de prédire la présence de contamination bactérienne d'origine non fécale (*Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella...*) ainsi que de contaminations non bactériennes (virus et parasites).

Des tests de détection moléculaire basés sur la PCR pour 15 rechercher spécifiquement des microorganismes pathogènes (bactéries, virus parasites) ont donc été développés.

Dans le domaine de la détection des bactéries, on notera notamment le brevet européen EP-A-0 438 115 qui décrit une méthode de détection des microorganismes pathogènes *Legionella* et des indicateurs de contamination fécale, via une étape d'amplification enzymatique in vitro dans 20 des échantillons aquatiques environnementaux.

Plusieurs publications font également état de tests PCR pour déterminer les Salmonelles dans l'eau et l'environnement, [Way, J.S. et al., Appl. Environm. Microbiol., 1993, n° 59, p. 1473-1479] [Waage, A.S. et al., Appl. Microbiol., 1999, n° 87, p. 418-428], de même que les Légionnelles [Bej, A.K., 25 Appl. Environ. Microbiol., 1991, n° 57, p. 2429-2432],

Dans US-B-5,298,392 la détection d'indicateurs de contaminations fécales et pathogènes est décrite.

Dans le domaine de la détection des virus, leur présence n'étant 30 pas corrélée à celle des indicateurs de contamination fécale traditionnellement recherchés dans le contrôle sanitaire de l'eau, des méthodes d'analyse rapides et efficaces sont nécessaires notamment pour le contrôle des contaminations virales des eaux.

Les méthodes conventionnelles pour détecter les virus dans l'eau 35 et l'environnement requièrent une étape de culture cellulaire animale, méthode longue, lourde et contraignante, restreinte à quelques familles de virus.

De nombreuses méthodes basées sur une étape d'amplification enzymatique ont été décrites pour rechercher les virus pathogènes dans l'eau et l'environnement. A titre d'exemples, on pourra citer, pour la détection par RT-PCR des Enterovirus, Hépatite A et Rotavirus, dans des échantillons d'eau  
5 [Abaszadegan M. et al., Appl. Environ. Microbiol., 1997, n° 63(1), p. 324-328] et [Gilgen M. et al., International Journal of food Microbiology, 1997 , n° 37, p. 189-199]

Dans le domaine de la détection des parasites notamment pour la détection de *Giardia* et *Cryptosporidium* qui sont deux parasites, dont la  
10 transmission dans l'eau et l'environnement sous une forme enkystée (oocyste et cyste) les rend particulièrement résistants aux traitements classiques de désinfection comme la chloration, des méthodes conventionnelles standardisées (EPA 1622-1623 et DWI) ont été mises au point. Elles comprennent une étape de filtration suivie d'une capture immunomagnétique  
15 (IMS) des oocystes et d'une détection par immunofluorescence (IFA). Ces méthodes sont longues, fastidieuses, non spécifiques des espèces pathogènes pour l'homme (*Giardia lamblia* et *Cryptosporidium parvum*) et ne permettent pas de déterminer la viabilité des parasites détectés.

Des méthodes moléculaires plus rapides, sensibles et spécifiques  
20 basées sur une étape d'amplification enzymatique (PCR) ont été décrites.

Dans WO-A-94/02635, WO-A-97/02281 et US-A-5,693,472 des amorces et sondes pour détecter l'espèce *C. parvum* dans des échantillons aquatiques et/ou biologiques sont décrits.

EP-A-0 453 290 et US-A-5,558,989 décrivent une méthode de  
25 détection de l'espèce pathogène chez l'homme, *Giardia lamblia*, basée sur l'utilisation de sondes nucléiques (ADN et/ou ARN) correspondant à la séquence de 18S rRNA. EP-A-0 550 883 décrit un test PCR avec réactifs pour rechercher *G. lamblia* dont la sensibilité est de 1-5 oocystes / ml de concentrat d'eau.

30 Des méthodes moléculaires distinguant les parasites morts des parasites viables et/ou infectieux permettant ainsi de mieux apprécier le risque sanitaire réel posé par la présence de ces parasites dans l'eau ont été décrites.

On citera notamment WO-A-97/42349 qui concerne la détection des *Cryptosporidium* et *Giardia* viables (par détection des ARNm des protéines de chocs thermiques hsp 70) et/ou infectieux (culture cellulaire et amplification enzymatique) et US-A-5,556,774 qui concerne une méthode de détection des

1. *Cryptosporidium* viables par combinaison d'une étape PCR et une étape d'excystation in vitro.

Si les principales méthodes moléculaires citées ci-dessus pour rechercher des indicateurs de contamination et des microorganismes 5 pathogènes incluant des bactéries, parasites, et virus sont beaucoup plus performantes que les méthodes classiques en termes de rapidité, sensibilité et spécificité, elles ne ciblent qu'un type de micro-organisme par test.

Aussi pour mesurer ou détecter plusieurs paramètres il faudrait mettre en œuvre autant de tests spécifiques, que de paramètres à mesurer ou 10 détecter, ce qui rend une analyse microbiologique complète extrêmement lourde.

Quelques approches de multidétection ont été décrites mais leur capacité de multidétection est faible puisqu'elles ne détectent au maximum que 3 paramètres.

15 On citera en particulier la technique de multiplex PCR qui consiste à réaliser plusieurs réactions PCR dans le même tube.

A titre d'exemple dans [Bej, A.K. et al., Appl. Environ. Microbiol., 1991, n° 57, p. 597-700] on décrit la détection simultanée de *Legionella* et *L. pneumophila* et la détection simultanée sur *E. coli*, *Salmonella* et *Shigella*, 20 dans [Bej, A.K. et al., Appl. Environ. Microbiol., 1991, n° 57, p. 2429-2432] la détection simultanée des coliformes totaux, *E. coli* et *Shigella*, et dans EP-A-0 438 115 la détection des Legionnelles et indicateurs de contamination fécales.

La technique d'hybridation in situ (FISH) réalisée avec deux ou au maximum trois sondes fluorescentes peut permettre de détecter plusieurs 25 paramètres simultanément mais avec une sensibilité moins élevée que les méthodes d'amplification enzymatique citées ci-dessus.

Dans la publication [Eggers, M. et al., Presented at the 27<sup>th</sup> International Conference on Environmental Systems, 1997], on décrit une approche pour détecter simultanément des microorganismes de l'eau et l'air 30 dans l'espace. Cette approche ne cible que les bactéries, par exemple *E. coli* et *Vibrio proteolyticus*, par hybridation directe de l'ARNr 16S sur un support solide (microplaqué à 96 trous). Il n'y a pas d'étape d'amplification enzymatique aussi la sensibilité est peu élevée, et la capacité de multidétection est restreinte à quelques microorganismes, néanmoins une méthode de multidétection dans 35 l'eau et l'air utilisant une technique apparentée aux biopuces est décrite.

Avant de poursuivre, et pour la clarté et la bonne compréhension, différents termes utilisés dans la description et les revendications nécessitent d'être définis.

- Un fragment nucléotidique, ou un oligonucléotide, ou un polynucléotide, est un enchaînement de motifs nucléotidiques assemblés entre eux par des liaisons ester phosphorique, caractérisé par la séquence informationnelle des acides nucléiques naturels, susceptibles de s'hybrider à un fragment nucléotidique dans des conditions prédéterminées, l'enchaînement pouvant contenir des monomères de structures différentes et être obtenu à partir d'une molécule d'acide nucléique naturelle et/ou par recombinaison génétique et/ou par synthèse chimique.

- Un motif nucléotidique est dérivé d'un monomère qui peut être un nucléotide naturel d'acide nucléique dont les éléments constitutifs sont un sucre, un groupement phosphate et une base azotée ; dans l'ADN le sucre est le désoxy-2-ribose, dans l'ARN le sucre est le ribose ; selon qu'il s'agisse de l'ADN ou de l'ARN, la base azotée est choisie parmi l'adénine, la guanine, l'uracile, la cytosine, la thymine ; ou bien le monomère est un nucléotide modifié dans l'un au moins des trois éléments constitutifs précités ; à titre d'exemple, la modification peut intervenir soit au niveau des bases, avec des bases modifiées telles que l'inosine, la méthyl-5-désoxycytidine, la désoxyuridine, la diméthylamino-5-désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5-désoxyuridine ou toute autre base modifiée capable d'hybridation, soit au niveau du sucre, par exemple le remplacement d'au moins un désoxyribose par un polyamide [P.E. Nielsen et al, Science, 1991, n° 254, p. 1497-1500], soit encore au niveau du groupement phosphate, par exemple son remplacement par des esters notamment choisis parmi les diphosphates, alkyl- et aryl-phosphonates et phosphorothioates.

- Par "séquence « informationnelle », on entend toute suite ordonnée de motifs de type nucléotidique, dont la nature chimique et l'ordre dans un sens de référence constituent une information de même qualité que celle des acides nucléiques naturels.

- Par hybridation, on entend le processus au cours duquel, dans des conditions appropriées, deux fragments nucléotidiques, ayant des séquences suffisamment complémentaires sont susceptibles de former un double brin avec des liaisons hydrogène stables et spécifiques. Un fragment nucléotidique « capable de s'hybrider » avec un polynucléotide est un fragment

pouvant s'hybrider avec ledit polynucléotide dans des conditions d'hybridation, qui peuvent être déterminées dans chaque cas de façon connue. Les conditions d'hybridation sont déterminées par la stringence, c'est-à-dire la rigueur des conditions opératoires. L'hybridation est d'autant plus spécifique 5 qu'elle est effectuée à plus forte stringence. La stringence est définie notamment en fonction de la composition en bases d'un duplex sonde/cible, ainsi que par le degré de mésappariement entre deux acides nucléiques.

La stringence peut également être fonction des paramètres de la réaction, tels que la concentration et le type d'espèces ioniques présentes dans 10 la solution d'hybridation, la nature et la concentration d'agents dénaturants et/ou la température d'hybridation. La stringence des conditions dans lesquelles une réaction d'hybridation doit être réalisée dépendra principalement des sondes utilisées. Toutes ces données sont bien connues et les conditions appropriées peuvent être déterminées par l'homme du métier.

15 En général, selon la longueur des sondes utilisées, la température pour la réaction d'hybridation est comprise entre environ 20 et 65°C, en particulier entre 35 et 65°C dans une solution saline à une concentration d'environ 0,8 à 1 molaire.

- Une sonde est un fragment nucléotidique comprenant de 5 à 100 20 monomères, notamment de 6 à 35 monomères, possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour former un complexe d'hybridation avec un fragment nucléotidique ayant, par exemple, une séquence nucléotidique comprise dans un ARN ribosomique, l'ADN obtenu par transcription inverse dudit ARN ribosomique et l'ADN (appelé ici ADN 25 ribosomique ou ADNr) dont ledit ARN ribosomique est le produit de transcription ; une sonde peut être utilisée à des fins de diagnostic (notamment sondes de capture ou de détection).

- Une sonde de capture est immobilisée ou immobilisable sur un support solide par tout moyen approprié, c'est-à-dire directement ou 30 indirectement, par exemple par covalence ou adsorption.

- Une sonde de détection peut être marquée au moyen d'un marqueur choisi parmi les isotopes radioactifs, des enzymes (notamment une peroxydase, une phosphatase alcaline, ou une enzyme susceptible 35 d'hydrolyser un substrat chromogène, fluorogène ou luminescent), des composés chimiques chromophores, des composés chromogènes, fluorogènes

- ou luminescents, des analogues de bases nucléotidiques, et des ligands tels que la biotine.

5 - Une amorce est une sonde comprenant de 5 à 100, préférentiellement de 10 à 40 motifs nucléotidiques et possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour l'initiation d'une polymérisation enzymatique, par exemple dans une technique d'amplification telle que la PCR (Polymerase Chain Reaction), dans un procédé de séquençage, dans une méthode de transcription inverse, etc..

10 - L'identité entre un fragment et une séquence de référence, qui caractérise le degré d'identité entre ledit fragment et ladite séquence, est mesuré par alignement dudit fragment sur ladite séquence puis détermination du nombre de monomères identiques entre les deux.

Les sondes et amorces selon l'invention sont choisies parmi :

15 (a) les séquences identifiées dans le listage de séquences annexé à la description,

(b) tout fragment des séquences (a), à la fois, comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque des séquences (a) et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite séquence (a) ; à titre d'exemple, un fragment (b) comporte 10 nucléotides parmi lesquels 20 5 nucléotides contigus appartiennent à une séquence (a) et au moins 2 nucléotides des 5 nucléotides restants sont identiques respectivement aux deux nucléotides correspondants dans la séquence de référence, après alignement.

25 - Par séquence d'identification, on désigne toute séquence ou tout fragment tel que défini ci-dessus, pouvant servir de sonde de détection et/ou de capture.

- Par traitement du milieu aqueux, on entend toute étape de filtration et/ou de lyse et/ou de purification.

30 - Par étape de lyse, on entend une étape capable de libérer les acides nucléiques contenus dans les enveloppes protéiques et/ou lipidiques des microorganismes (comme des débris cellulaires qui perturbent les réactions ultérieures). A titre d'exemple, on peut utiliser les méthodes de lyse telles que décrite dans les demandes de brevet de la Demanderesse :

35 WO-A-00/05338 sur la lyse mixte magnétique et mécanique,  
WO-A-99/53304 sur la lyse électrique, et  
WO-A-99/15321 sur la lyse mécanique.

L'homme du métier pourra utiliser d'autres méthodes de lyse bien connues telles que les chocs thermiques ou osmotiques ou les lyses chimiques par des agents chaotropiques tels que les sels de guanidium (US-A-5,234,809).

5 - Par étape de purification, on entend la séparation entre les acides nucléiques des micro-organismes et les constituants cellulaires relargués dans l'étape de lyse. Cette étape permet généralement de concentrer les acides nucléiques. A titre d'exemple, on peut utiliser des particules magnétiques éventuellement revêtues d'oligonucléotides, par adsorption ou covalence (voir 10 à ce sujet les brevets US-A-4,672,040 et US-A-5,750,338), et ainsi purifier les acides nucléiques qui se sont fixés sur ces particules magnétiques, par une étape de lavage. Cette étape de purification des acides nucléiques est particulièrement intéressante si l'on souhaite amplifier ultérieurement lesdits 15 acides nucléiques. Un mode de réalisation particulièrement intéressant de ces particules magnétiques est décrit dans les demandes de brevet déposées par la Demanderesse sous les références suivantes : WO-A-97/45202 et WO-A-99/35500.

Dans la dernière de ces demandes de brevet, il s'agit de particules magnétiques thermosensibles ayant chacune un noyau magnétique recouvert 20 d'une couche intermédiaire. La couche intermédiaire est elle-même recouverte par une couche externe à base d'un polymère susceptible d'interagir avec au moins une molécule biologique, le polymère externe est thermosensible et présente une température critique inférieure de solubilité (LCST) prédéterminée comprise entre 10 et 100°C et de préférence entre 20 et 60°C. 25 Cette couche externe est synthétisée à partir de monomères cationiques, qui génèrent un polymère ayant la capacité de lier les acides nucléiques. Cette couche intermédiaire isole les charges magnétiques du noyau, afin d'éviter les problèmes d'inhibition des techniques d'amplification de ces acides nucléiques.

Un autre exemple intéressant de méthode de purification des 30 acides nucléiques est l'utilisation de silice soit sous forme de colonne (kits Qiagen par exemple), soit sous forme de particules inertes [Boom R. et al., J. Clin. Microbiol., 1990, n°28(3), p. 495-503] ou magnétiques (Merck: MagPrep® Silica, Promega: MagneSii™ Paramagnetic particles). D'autres méthodes très répandues reposent sur des résines échangeuses d'ions en colonne (kits 35 Qiagen par exemple) ou en format particulaire paramagnétique (Whatman: DEAE-Magarose) [Levison PR et al., J. Chromatography, 1998, p. 337-344].

Une autre méthode très pertinente pour l'invention est celle de l'adsorption sur support d'oxyde métallique (société Xtrana: matrice Xtra-Bind<sup>TM</sup>).

- Par étape de détection on entend soit une détection directe par une méthode physique, soit une méthode de détection à l'aide d'un marqueur.

5 De nombreuses méthodes de détection existent pour la détection des acides nucléiques. [Voir par exemple Kricka et al., Clinical Chemistry, 1999, n° 45(4), p.453-458 ou Keller G.H. et al., DNA Probes, 2nd Ed., Stockton Press, 1993, sections 5 et 6, p.173-249].

Dans un premier mode de réalisation de l'invention, une méthode  
10 d'hybridation à l'aide de sondes spécifiques est mise en œuvre pour l'étape de détection. Ce mode d'exécution particulier consiste à mettre en contact les acides nucléiques, amplifiés ou non, des micro-organismes à détecter avec une sonde de capture fixée sur un support solide, et capable de s'hybrider spécifiquement avec lesdits acides nucléiques; puis à révéler, selon les  
15 méthodes connues, la présence éventuelle des acides nucléiques fixés au support solide notamment par l'intermédiaire d'au moins une sonde de capture.

Par "marqueur", on entend un traceur capable d'engendrer un signal. Une liste non limitative de ces traceurs comprend les enzymes qui produisent un signal détectable par exemple par colorimétrie, fluorescence ou luminescence, comme la peroxydase de raifort, la phosphatase alcaline, la bêtagalactosidase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase ; les chromophores comme les composés fluorescents, luminescents ou colorants ; les groupements à densité électronique détectable par microscopie électronique ou par leurs propriétés électriques comme la conductivité, par les  
20 méthodes d'ampérométrie ou de voltamétrie, ou par des mesures d'impédance ; les groupements détectables par des méthodes optiques comme la diffraction, la résonance plasmon de surface, la variation d'angle de contact ou par des méthodes physiques comme la spectroscopie de force atomique, l'effet tunnel, etc. ; les molécules radioactives comme <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S ou <sup>125</sup>I.

30 Ainsi, le polynucléotide peut être marqué pendant l'étape d'amplification enzymatique, par exemple en utilisant un nucléotide triphosphate marqué pour la réaction d'amplification. Le nucléotide marqué sera un désoxyribonucléotide dans les systèmes d'amplification générant un ADN, comme la PCR, ou un ribonucléotide dans les techniques d'amplification  
35 générant un ARN, comme les techniques TMA ou NASBA.

Le polynucléotide peut aussi être marqué après l'étape d'amplification, par exemple en hybridant une sonde marquée selon la technique d'hybridation sandwich décrite dans le document WO-A-91/19812.

Un autre mode particulier préférentiel de marquage d'acides nucléiques est décrit dans la demande FR-A-2 780 059 de la Demanderesse. Un autre mode préférentiel de détection utilise l'activité exonucléase 5'-3' d'une polymérase tel que décrit par Holland P.M., PNAS (1991) p 7276-7280.

Des systèmes d'amplification du signal peuvent être utilisés comme décrit dans le document WO-A-95/08000 et, dans ce cas, la réaction préliminaire d'amplification enzymatique peut ne pas être nécessaire.

- Par amplification enzymatique, on entend une processus générant de multiples copies d'un fragment nucléotidique particulier à l'aide d'amorces spécifiques par l'action d'au moins une enzyme. Ainsi, pour l'amplification des acides nucléiques, il existe, entre autres, les techniques suivantes :

- 15 - PCR (Polymerase Chain Reaction), telle que décrite dans les brevets US-A-4,683,195, US-A-4,683,202 et US-A-4,800,159,
- LCR (Ligase Chain Reaction), exposée par exemple dans la demande de brevet EP-A-0 201 184,
- RCR (Repair Chain Reaction), décrite dans la demande de brevet 20 WO-A-90/01069,
- 3SR (Self Sustained Sequence Replication) avec la demande de brevet WO-A-90/06995,
- NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) avec la demande de brevet WO-A-91/02818, et
- 25 - TMA (Transcription Mediated Amplification) avec le brevet US-A-5,399,491.

On parle alors d'amplicons pour désigner les polynucléotides générés par une technique d'amplification enzymatique.

- Le terme "support solide" tel qu'utilisé ici inclut tous les matériaux sur lesquels peut être immobilisé un acide nucléique. Des matériaux de synthèse, ou des matériaux naturels, éventuellement modifiés chimiquement, peuvent être utilisés comme support solide, notamment les polysaccharides tels que les matériaux à base de cellulose, par exemple du papier, des dérivés de cellulose tels que l'acétate de cellulose et la nitrocellulose, ou le dextran ; 30 des polymères, des copolymères, notamment à base de monomères du type styrène, des fibres naturelles telles que le coton, et des fibres synthétiques 35

telles que le nylon ; des matériaux minéraux tels que la silice, le quartz, des verres, des céramiques ; des latex ; des particules magnétiques ; des dérivés métalliques, des gels etc. Le support solide peut être sous la forme d'une plaque de microtitration, d'une membrane comme décrit dans la demande  
5 WO -A-94/12670, d'une particule ou d'une biopuce.

- Par "biopuce", on entend un support solide de dimension réduite où sont fixés une multitude de sondes de capture à des positions prédéterminées.

A titre d'illustration, des exemples de ces biopuces sont donnés  
10 dans les publications de [G. Ramsay, Nature Biotechnology, 1998, n°16, p. 40-44 ; F. Ginot, Human Mutation, 1997, n°10, p.1-10 ; J. Cheng et al, Molecular diagnosis, 1996, n°1(3), p.183-200 ; T. Livache et al, Nucleic Acids Research, 1994, n° 22(15), p. 2915-2921 ; J. Cheng et al, Nature Biotechnology, 1998, n° 16, p. 541-546] ou dans les brevets US-A-4,981,783, US-A-5,700,637, US-A-  
15 5,445,934, US-A-5,744,305 et US-A-5,807,522.

La caractéristique principale du support solide doit être de conserver les caractéristiques d'hybridation des sondes de capture sur les acides nucléiques tout en générant un bruit de fond minimum pour la méthode de détection. Un avantage des biopuces est qu'elles simplifient l'utilisation de nombreuses sondes de capture permettant ainsi la détection multiple de micro-organismes à détecter tout en tenant compte du polymorphisme desdits micro-organismes à détecter

L'invention décrite ci-après permet de résoudre les problèmes posés par les méthodes précédemment décrites, à la fois en terme de sensibilité, spécificité et capacité de multidétection, tout en étant rapide et facile à mettre en œuvre.

Un premier objet de l'invention est un procédé de contrôle de la qualité microbiologique d'un milieu aqueux environnemental, susceptible de comporter différents micro-organismes, comprenant les étapes suivantes :

- 30 - on choisit un ensemble de référence, constitué d'au moins trois micro-organismes, représentatifs, ensemble ou séparément, d'un niveau de qualité microbiologique,
- on dispose d'un nécessaire de détermination microbiologique, constitué d'au moins trois sondes d'identification spécifiquement et  
35 respectivement desdits trois microorganismes,

- après traitement du milieu à analyser, on met - lesdits microorganismes, ou toute fraction obtenue à partir de ces derniers, en contact avec ledit nécessaire de détermination, moyennant quoi on multi-détermine lesdits microorganismes,

5 cette détermination étant représentative du niveau de qualité microbiologique du milieu.

L'invention concerne aussi un nécessaire de détermination microbiologique comprenant un mélange de sondes d'identification de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites, lesdites sondes d'identification étant 10 chacune spécifiques d'une espèce ou au moins d'un genre de bactérie, virus ou parasite susceptible d'être présent dans un échantillon de liquide à doser.

Selon l'invention, un nécessaire désigne toute méthode manuelle, semi-automatique ou automatique permettant la mise en œuvre d'un moyen de dosage, dosage signifiant l'identification et/ou la détermination de la viabilité 15 et/ou la quantification, chacun de ces trois paramètres étant déterminés en séquence ou selon les combinaisons : identification seule ; identification et quantification ; identification et viabilité ; identification, quantification et viabilité.

Cette invention concerne également une méthode de multidétection utilisant en particulier la technique des biopuces pour rechercher un grand 20 nombre des paramètres microbiologiques incluant des indicateurs de contamination exigés dans les différentes législations (USA, France, Europe) et des microorganismes pathogènes incluant des bactéries, virus et parasites.

En une seule mise en œuvre une analyse microbiologique complète d'un échantillon peut être réalisée avec rapidité en par exemple 25 environ 4 heures et avec une grande sensibilité par exemple de l'ordre de 1 micro cible/10l-100l grâce à l'étape d'amplification enzymatique.

Cette méthode de multidétection est spécifique des espèces recherchées grâce à l'utilisation de séquences, dites séquences d'identification de chaque espèce, comme sonde, et peut permettre de déterminer la viabilité 30 des microorganismes par la détection de marqueurs de viabilité comme par exemple, ARNr et/ou ARNm.

La rapidité, la sensibilité et la spécificité de cette méthode de multidétection, permettent de l'appliquer indifféremment à tout milieu aqueux environnemental, c'est à dire tout milieu aqueux à l'exclusion de tout fluide corporel. En particulier cette méthode s'applique à toute eau destinée à la 35 consommation humaine, eaux propres industrielles, eaux résiduaires urbaines

et industrielles, eaux de l'industrie agro-alimentaire, eaux de process et à tout fluide ou produit.

Cette détection simultanée en une seule étape de multiples produits d'amplifications spécifiques, est possible grâce à l'utilisation de 5 support solide en particulier sous la forme d'un support solide de dimension réduite où sont fixées une multitude de sondes de capture à des positions prédéterminées, ou « biopuce », ces sondes de capture étant constituées par un jeu de fragments ou de la totalité de séquences nucléotidiques spécifiques dites séquences d'identification des microorganismes recherchés.

10 Ces séquences d'identification ou ces fragments peuvent également être mis en œuvre dans toutes les techniques d'hybridation connues comme les techniques de dépôt ponctuel sur filtre dites "DOT-BLOT" [Maniatis et al, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, 1982], les techniques de transfert d'ADN dites "SOUTHERN BLOT" [Southern E. M., J. Mol. Biol., 1975, 98, 503], 15 les techniques de transfert d'ARN dites "NORTHERN BLOT", ou les techniques "SANDWICH" [Dunn A.R. et al., Cell, 1977, 12,23].

Parmi les microorganismes recherchés, on citera à titre d'exemple les microorganismes suivants :

Parmi les bactéries :

20 *Escherichia coli*, *Escherichia coli* SEROTYPE 0157 :H7, *Helicobacter pylori*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus epidermatitis*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Acinetobacter baumanii*, *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, le genre *Mycobacterium*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium marinum*, 30 *Mycobacterium gordonaiae*, le genre *Legionella*, *Legionella pneumophila*, le genre *Salmonella*.

Parmi les virus et plus particulièrement parmi les *Adenovirus*, les *Adeno virus 40*, et les *Adeno virus 41bis* ;

les *Astrovirus*, *HastV-1-2* ;

35 les *Enterovirus*, tels que *Poliovirus*, *Coxsackievirus*, ou *Echovirus*, les *Rotavirus*,

*les Calicivirus, tels que Virus de Norwalk, Virus de Sapporo,*

*et les virus de l'Hépatite tels que le virus de l'Hépatite A,*

**Parmi les parasites :**

*Le genre Cryptosporidium, tel que Cryptosporidium parvum, le*

5 *genre Giardia, tel que Giardia lamblia et les Microsporidies.*

Les microorganismes peuvent être recherchés au niveau du genre

auquel ils appartiennent soit au niveau taxonomique inférieur c'est à dire au niveau de l'espèce, soit au niveau des sérotypes, des sous-types et en épidémiologie : par exemple pour *Legionella* la détermination pourra être

10 effectuée par la séquence d'identification SEQ ID NO:9 pour la recherche au niveau du genre et par SEQ ID NO:10 ou 11 pour une détermination par une séquence d'identification spécifique de la bactérie *Legionella pneumophila*.

Les séquences matérialisées sur la biopuce, dites séquences d'identification correspondant aux espèces recherchées seront choisies parmi

15 les séquences dont la liste est jointe en annexe de SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:104.

Des variantes de mises en œuvre du procédé selon l'invention sont ci-après exposées.

Le nécessaire de détermination microbiologique exposé aux 20 microorganismes du milieu aqueux répond avantageusement à l'une quelconque des présentations suivantes :

Les trois sondes d'identification qu'il comprend ont au moins une séquence choisie parmi l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos :1-104, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus 25 inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Il comprend au moins une sonde d'identification spécifique à une bactérie, au moins une sonde d'identification spécifique à un parasite et au moins une sonde d'identification spécifique à un virus ; de préférence, il 30 comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO :1 à SEQ ID NO :39, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66 à SEQ ID NO:69 et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence ; au moins 35 une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:49, SEQ ID NO :63 à SEQ ID NO :65, et tous fragments de celles-ci comprenant

au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence ; et au moins une séquence choisie parmi entre SEQ ID NO:50 à SEQ ID NO:60, et SEQ ID NO:70 à SEQ ID NO:104, et tous fragments 5 de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Il comprend au moins quatre sondes d'identification spécifiques à au moins quatre bactéries différentes ; de préférence, elles sont choisies parmi 10 SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:66 à SEQ ID NO:69 et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence:

15 Il comprend au moins cinq sondes d'identification spécifiques à au moins cinq virus différents ; de préférence, elles sont choisies parmi SEQ ID NO:50 à SEQ ID NO:60, et SEQ ID NO:70 à SEQ ID NO:104, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Le nécessaire de détermination microbiologique comprend au moins deux sondes d'identification spécifiques à au moins deux parasites ; de préférence, elle est choisie parmi SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:49 et SEQ ID NO:63 à SEQ ID NO :65, et tous fragments de celles-ci comprenant au 25 moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Le nécessaire de détermination microbiologique comprend au moins une sonde d'identification spécifique à une bactérie et au moins une 30 sonde d'identification spécifique à au moins un parasite. De préférence, il comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:67 à SEQ ID NO:69, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont 35 la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence, et au moins une sonde d'identification comprise SEQ ID NO:40 à

SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:63 à SEQ ID NO:65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

5 Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les bactéries suivantes : *Escherichia coli*, genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*. De préférence, au moins une sonde d'identification du nécessaire est choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:15, SEQ ID  
10 NO:23, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les bactéries suivantes : *Escherichia coli*,  
15 genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*. De préférence, au moins une sonde d'identification dudit nécessaire est choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus  
20 dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les microorganismes suivants : *Escherichia coli*, genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Genre Cryptosporidium*. De préférence, au moins une sonde dudit nécessaire est choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:44, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.  
30

Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les microorganismes suivants : genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Gardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*. De préférence, au moins une sonde dudit nécessaire est choisie parmi SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:46 à SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64 et SEQ ID NO :65, et tous fragments de celles-ci comprenant au  
35

moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les microorganismes suivants : *Escherichia coli*, *Enterovirus*, *Genre Cryptosporidium*, De préférence, au moins une sonde d'identification dudit nécessaire est choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:53 à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:70 à SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:44, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les microorganismes suivants : *Escherichia coli*, *Escherichia coli* sérotype 0157 :H7, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Clostridium perfringens*, *Genre Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Enterovirus*: virus de la poliomylérite, virus coxsackie A et B, *Echovirus*, *Genre Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, genre *Giardia*, *Giardia lamblia*. De préférence, au moins une sonde d'identification du nécessaire est choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25 à SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:53 à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:61 à SEQ ID NO:75, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les microorganismes suivants : *Escherichia coli*, *Escherichia coli* sérotype 0157 :H7, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Clostridium perfringens*, *Genre Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Enterovirus*: virus de la poliomylérite, virus coxsackie A et B, *Echovirus*, *Genre Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, genre *Giardia*, *Giardia lamblia*, *Genre Legionella*, *Legionella pneumophila*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, Virus de l'hépatite A, *Calicivirus* : Norwalk et

*Sapporo Virus, Adenovirus, Rotavirus.* De préférence, au moins une sonde d'identification du nécessaire est choisie parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:9 à SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:14 à SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25 à SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:51, SEQ 5 ID NO:53 à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56 à SEQ ID NO:104, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination 10 microbiologique sont choisis parmi les microorganismes suivants : *Escherichia coli*, *Escherichia coli* sérotype 0157:H7, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Clostridium perfringens*, *Genre Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Enterovirus*: virus de la poliomyélite, virus coxsackie A 15 et B, *Echovirus*, *Genre Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, *genre Giardia*, *Giardia lamblia*, *Genre Legionella*, *Legionella pneumophila*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, Virus de l'hépatite A, *Calicivirus*: Norwalk et *Sapporo Virus*, *Adenovirus*, *Rotavirus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Genre Mycobactéries*, *Mycobacterium avium*; *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium gordonae*, *Acinetobacter baumanii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Astrovirus*. De préférence, au moins 20 une sonde d'identification du nécessaire de détermination est choisie parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:9 à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56 à SEQ ID NO:104, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque 25 séquence.

Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les bactéries suivantes : *Escherichia coli*, *Escherichia coli* SEROTYPE 0157:H7, *Helicobacter pylori*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, 30 *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter coli*,

*Campylobacter jejuni, Aeromonas hydrophila, Aeromonas caviae, Aeromonas sobria, Pseudomonas aeruginosa, Vibrio cholerae, Acinetobacter baumanii, Burkholderia gladioli, Burkholderia cepacia, Stenotrophomonas maltophilia, le genre Mycobactéries, Mycobacterium avium, Mycobacterium intracellulare, 5 Mycobacterium simiae, Mycobacterium kansasii, Mycobacterium xenopi, Mycobacterium marinum, Mycobacterium gordonae, le genre Legionella, Legionella pneumophila, le genre Salmonella.*

Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les virus suivants :

- 10      *les Adenovirus, tels que Adeno virus 40, Adeno virus 41bis;*
- les Astrovirus, HAstV-1-2;*
- les Enterovirus, tels que Poliovirus, Coxsackievirus, Echovirus,*
- les Rotavirus,*
- les Calicivirus, tels que Virus de Norwalk, Virus de Sapporo, et les virus de l'Hépatite tel que le virus de l'Hépatite A.*
- 15      Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les parasites suivants :
- Le genre Cryptosporidium, Cryptosporidium parvum, genre Giardia, Giardia lamblia et les Microsporidies.*

- 20      Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les microorganismes suivants : *Escherichia coli, Escherichia coli sérotype 0157 :H7, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Enterococcus durans, Enterococcus hirae, Streptococcus bovis, Streptococcus equinus, Clostridium perfringens, Genre Salmonella,*
- 25      *Staphylococcus aureus, Enterovirus: virus de la poliomyélite, virus coxsackie A et B, Echovirus, Genre Cryptosporidium, Cryptosporidium parvum, genre Giardia, Giardia lamblia, Genre Legionella, Legionella pneumophila, Aeromonas hydrophila, Aeromonas caviae, Aeromonas sobria, Campylobacter coli, Campylobacter jejuni, Virus de l'hépatite A.* De préférence, au moins une sonde d'identification du nécessaire est choisie parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:9 à SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:14 à SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25 à SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:53 à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56 à SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:97, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont

la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les microorganismes suivants : *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Clostridium perfringens*, *Genre Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Enterovirus*: virus de la poliomérite, virus coxsackie A et B, *Echovirus*, *Genre Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, genre *Giardia*, *Giardia lamblia*, *Genre Legionella*, *Legionella pneumophila*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, Virus de l'hépatite A. De préférence, au moins une sonde d'identification du nécessaire est choisie parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:9 à SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:14 à SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25 à SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:53 à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56 à SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70 à SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:97, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les bactéries suivantes :

*Escherichia coli*, *Escherichia coli SEROTYPE O157:H7*, *genre Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *genre Mycobacterium*, *genre Legionella*, *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus*. De préférence au moins une sonde d'identification du nécessaire de détermination est choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO 62, SEQ ID NO 66 à SEQ ID NO 69, SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 30, SEQ ID NO 9 à SEQ ID NO 11, SEQ ID 23, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les virus suivants :

35 *Virus de l'hépatite A*, *Enterovirus*, et au moins un virus choisi parmi les *Calicivirus* et les *Rotavirus*. De préférence au moins une sonde

d'identification du nécessaire de détermination est choisie parmi SEQ ID NO 59, SEQ ID NO :60 SEQ ID NO 97, SEQ ID NO 70 à SEQ ID NO 96, SEQ ID NO :98 à SEQ ID NO :104, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites 5 séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les virus suivants :

10 *Virus de l'hépatite A, Enterovirus, au moins un virus choisi parmi le virus de Norwalk et les Rotavirus.* De préférence au moins une sonde d'identification du nécessaire de détermination est choisie parmi SEQ ID NO 98 à 104, SEQ ID NO 59, SEQ ID NO 56 à SEQ ID NO 58, SEQ ID NO :60, SEQID NO :97, SEQ ID NO :70 à SEQ ID NO :75, SEQ ID NO 76 à SEQ ID NO 96, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères 15 contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les parasites suivants : *genre Cryptosporidium, Cryptosporidium parvum, genre Giardia, Giardia Lamblia.* De 20 préférence au moins une sonde d'identification du nécessaire de détermination est choisie parmi SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO 45, SEQ ID NO 65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

25 Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi :

30 *Escherichia coli, Escherichia coli SEROTYPE O157:H7, genre Salmonella, Pseudomonas aeruginosa, genre Mycobacterium, genre Legionella, Legionella pneumophila, Staphylococcus aureus, Virus de l'hépatite A, Enterovirus, et au moins un virus choisi parmi les Calicivirus et les Rotavirus, genre Cryptosporidium, Cryptosporidium parvum, genre Giardia, Giardia Lamblia ;* de préférence, au moins une sonde d'identification du nécessaire de détermination est choisie parmi SEQ ID NO:14 , SEQ ID NO 62, SEQ ID NO 66 à SEQ ID NO 69, SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, 35 SEQ ID NO 30, SEQ ID NO 9 à SEQ ID NO 11, SEQ ID 23, SEQ ID NO 59, SEQ ID NO :60 SEQ ID NO 97, SEQ ID NO 70 à SEQ ID NO 96,

- SEQ ID NO :98, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO 45, SEQ ID NO 65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence, ou
- 5       *Escherichia coli*, *Escherichia coli* SEROTYPE O157:H7, genre *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, genre *Mycobacterium*, genre *Legionella*, *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus*, Virus de l'hépatite A, *Enterovirus*, et au moins un virus choisi parmi le virus de Norwalk et les *Rotavirus*, genre *Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, genre *Giardia*,
- 10      *Giardia Lamblia*; de préférence, au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14 , SEQ ID NO 62, SEQ ID NO 66 à SEQ ID NO 69, SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 30, SEQ ID NO 9 à SEQ ID NO 11, SEQ ID 23, SEQ ID NO 98 à 104, SEQ ID NO 59, SEQ ID NO 56 à SEQ ID NO 58, SEQ ID NO :60, SEQID NO :97, SEQ ID NO :70 à
- 15      SEQ ID NO :75, SEQ ID NO 76 à SEQ ID NO 96, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO 45, SEQ ID NO 65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.
- 20      Lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi Virus de Norwalk, Virus Hepatitis A, Enterovirus. De préférence, au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO 59, SEQ ID NO :60, SEQ ID NO 97, SEQ ID NO 70 à SEQ ID NO 75.
- 25      Les sondes de capture comportent avantageusement au moins 10, de préférence au moins 13, voire au moins 15, même au moins 17 bases et/ou au plus 35, de préférence au 25, voire au plus 20. Par exemple, une sonde de capture comporte entre 10 et 35 bases, avantageusement entre 17 et 20 bases, avec au moins une position d'interrogation située dans la région centrale de la séquence connue, en 12<sup>ème</sup> position par rapport à l'extrémité 3' de la séquence. Pour les espèces *E. coli* et *E. faecalis*, il y aura de préférence des sondes de capture de 17 bases, avec 2 positions d'interrogations : une en 10<sup>ème</sup> et une en 8<sup>ème</sup> position. Ces sondes de capture ont, suivant le cas des longueurs comprises entre 10 et 25 nucléotides. Les positions d'interrogation varient alors en fonction de la longueur de la sonde de capture.

Les séquences spécifiques dites séquences d'identification, ont été sélectionnées par des techniques de sélection informatique et sont chacune suffisamment spécifique d'une espèce et/ou d'un membre d'une espèce qu'elles permettent de discriminer des genres taxonomiquement proches et/ou 5 des espèces du même genre et d'éviter les phénomènes d'hybridation croisée.

Dans un mode de réalisation de l'invention le nécessaire de détermination microbiologique comprend un mélange de sondes d'identification de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites comprenant au moins quatre sondes d'identification spécifiques à au moins quatre bactéries différentes.

10 Dans un autre mode de réalisation de l'invention le nécessaire de détermination microbiologique comprend un mélange de sondes d'identification de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites comprenant au moins cinq sondes d'identification spécifiques à au moins cinq virus différents.

15 Dans un autre mode de réalisation de l'invention le nécessaire de détermination microbiologique comprend un mélange de sondes d'identification de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites comprenant au moins deux sondes d'identification spécifique à un parasite.

20 Dans un autre mode de réalisation de l'invention le nécessaire de détermination microbiologique comprend un mélange de sondes d'identification de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites comprenant au moins une sonde spécifique d'une bactérie et au moins une sonde d'identification spécifique d'un parasite.

25 Dans un autre mode de réalisation de l'invention le nécessaire de détermination microbiologique comprend un mélange de sondes d'identification de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites dont les sondes spécifiques des bactéries sont choisies parmi les sondes spécifiques des bactéries suivantes :

*Escherichia coli, Genre Salmonella, Staphylococcus aureus.*

30 Dans un autre mode de réalisation de l'invention le nécessaire de détermination microbiologique comprend un mélange de sondes d'identification de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites dont les sondes spécifiques des bactéries sont choisies parmi les sondes spécifiques des bactéries suivantes :

*Escherichia coli, genre Salmonella, Staphylococcus aureus,  
Clostridium perfringens.*

35 Dans un autre mode de réalisation de l'invention le nécessaire de détermination microbiologique comprend un mélange de sondes d'identification

- de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites dont les sondes spécifiques des bactéries sont choisies parmi les sondes spécifiques des bactéries suivantes :  
*Escherichia coli, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Enterococcus durans, Enterococcus hirae, Streptococcus bovis, Streptococcus equinus, Clostridium perfringens.*

5 Dans un autre mode de réalisation de l'invention le nécessaire de détermination microbiologique comprend un mélange de sondes d'identification de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites dont les sondes spécifiques des bactéries sont choisies parmi les sondes spécifiques des bactéries suivantes :

10 *Escherichia coli, Escherichia coli SEROTYPE 0157:H7, Helicobacter pylori, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Enterococcus durans, Enterococcus hirae, Streptococcus bovis, Streptococcus equinus, Clostridium perfringens, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus aureus, Campylobacter coli, Campylobacter jejuni, Aeromonas hydrophila,*

15 *Aeromonas caviae, Aeromonas sobria, Pseudomonas aeruginosa, Vibrio cholerae, Acinetobacter baumanii, Burkholderia gladioli, Burkholderia cepacia, Stenotrophomonas maltophilia, le genre Mycobactéries, Mycobacterium avium, Mycobacterium intracellulare, Mycobacterium simiae, Mycobacterium kansasii, Mycobacterium xenopi, Mycobacterium marinum, Mycobacterium gordonae, le genre Legionella, Legionella pneumophila, le genre Salmonella.*

20 Dans un autre mode de réalisation de l'invention le nécessaire de détermination microbiologique comprend un mélange de sondes d'identification de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites choisis les microorganismes suivants :

25 *Escherichia coli, Genre Salmonella, Staphylococcus aureus, Genre Cryptosporidium.*

30 Dans un autre mode de réalisation de l'invention le nécessaire de détermination microbiologique comprend un mélange de sondes d'identification de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites choisis les microorganismes suivants :

*Genre Salmonella, Staphylococcus aureus, Gardia lamblia, Cryptosporidium parvum.*

35 Dans un autre mode de réalisation de l'invention le nécessaire de détermination microbiologique comprend un mélange de sondes d'identification de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites choisis les microorganismes suivants :

5           *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*,  
*Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Clostridium perfringens*, *Genre Salmonella*, *Staphylococcus aureus*,  
*Enterovirus : virus de la poliomyélite*, *virus coxsackie A et B*, *Echovirus*, *Genre Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*,

Dans un autre mode de réalisation de l'invention le nécessaire de détermination microbiologique comprend un mélange de sondes d'identification de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites choisis les microorganismes suivants :

10          *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*,  
*Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Clostridium perfringens*, *Genre Salmonella*, *Staphylococcus aureus*,  
*Enterovirus : virus de la poliomyélite*, *virus coxsackie A et B*, *Echovirus*, *Genre Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, *Genre Legionella*,  
15          *Legionella pneumophila*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*,  
*Aeromonas sobria*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Virus de l'hépatite A*, *Calicivirus : Norwalk et Sapporo Virus*, *Adenovirus*, *Rotavirus*.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention le nécessaire de détermination microbiologique comprend un mélange de sondes d'identification de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites choisis les microorganismes suivants :

14          *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*,  
*Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Clostridium perfringens*, *Genre Salmonella*, *Staphylococcus aureus*,  
25          *Enterovirus : virus de la poliomyélite*, *virus coxsackie A et B*, *Echovirus*, *Genre Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, *Genre Legionella*,  
*Legionella pneumophila*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*,  
*Aeromonas sobria*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Virus de l'hépatite A*, *Calicivirus : Norwalk et Sapporo Virus*, *Adenovirus*, *Rotavirus*,  
30          *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Genre Mycobactéries*,  
*Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium simiae*,  
*Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium marinum*,  
*Mycobacterium gordonaiae*, *Acinetobacter baumanii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Astrovirus*.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention le nécessaire de détermination microbiologique comprend un mélange de sondes d'identification de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites choisis les microorganismes suivants :

5           *Escherichia coli, Enterovirus, Genre Cryptosporidium,*

Dans un autre mode de réalisation de l'invention le nécessaire de détermination microbiologique comprend un mélange de sondes d'identification de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites dont les sondes d'identification spécifiques des virus sont spécifiques des virus suivants :

10          *les Adenovirus, tel que Adeno virus 40, Adeno virus 41bis;*

*les Astrovirus, HastV-1-2;*

*les Enterovirus, tels que Poliovirus, Coxsackievirus, Echovirus,*

*les Rotavirus,*

*les Calicivirus, tels que Virus de Norwalk, Virus de Sapporo et,*

15          *les virus de l'Hépatite tel que le virus de l'Hépatite A.*

Dans un autre mode de réalisation de l'invention le nécessaire de détermination microbiologique comprend un mélange de sondes d'identification de bactéries et/ou de virus et/ou de parasites dont les sondes spécifiques des parasites sont choisies parmi les sondes spécifiques des parasites suivants :

20          *Le genre Cryptosporidium, Cryptosporidium parvum, Giardia lamblia et les Microsporidies.*

Selon l'invention dans un mode de réalisation, le nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:66 à SEQ ID NO:69 et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence ; au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:49, SEQ ID NO: 63 à SEQ ID NO:65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence ; et au moins une séquence choisie parmi SEQ ID NO:50 à SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:70 à SEQ ID NO:104, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus

dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Selon l'invention dans un mode de réalisation différent le nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent  
5 dans un échantillon comprend au moins 4 sondes d'identifications choisies parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:66 à SEQ ID NO:69, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque  
10 séquence.

Selon l'invention dans un mode de réalisation différent le nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon comprend au moins 5 sondes d'identification comprise entre SEQ ID NO:50 à SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:70 à SEQ ID NO:104, et  
15 tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Selon l'invention dans un mode de réalisation différent le nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent  
20 dans un échantillon comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:49, SEQ ID NO: 63 à SEQ ID NO:65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Selon l'invention dans un mode de réalisation différent le nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:66 à SEQ ID NO:69, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence, et au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:49, SEQ ID NO: 63 à SEQ ID NO:65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.  
25  
30  
35

Selon l'invention dans un mode de réalisation différent le nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, SEQ ID 5 NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Selon l'invention dans un mode de réalisation différent le 10 nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus 15 dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Selon l'invention dans un mode de réalisation différent le 20 nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:44, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Selon l'invention dans un mode de réalisation différent le 25 nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:53 à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:70 à SEQ ID NO:75, SEQ 30 ID NO:40 à SEQ ID NO:44, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Selon l'invention dans un mode de réalisation différent le 35 nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon comprend au moins une sonde d'identification choisie

parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25 à SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:53 à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:61 à SEQ ID NO:75, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites 5 séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Selon l'invention dans un mode de réalisation différent le nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon comprend au moins une sonde d'identification choisie 10 parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:14 à SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25 à SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:53 à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56 à SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60 à SEQ ID NO:65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus 15 dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Selon l'invention dans un mode de réalisation différent le nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon comprend au moins une séquence comprise entre SEQ ID 20 NO:1 à SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:9 à SEQ ID NO:22, et SEQ ID NO:23 à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56 à SEQ ID NO:104, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Selon l'invention dans un mode de réalisation différent le nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon comprend au moins une séquence choisie parmi SEQ ID 25 NO:14 , SEQ ID NO 62, SEQ ID NO 66 à SEQ ID NO 69, SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 30, SEQ ID NO 9 à SEQ ID NO 11, SEQ ID 30 23. et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Selon l'invention dans un mode de réalisation différent le nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent 35 dans un échantillon comprend au moins une séquence choisie parmi SEQ ID NO 59, SEQ ID NO 97, SEQ ID NO 70 à SEQ ID NO 75 et tous fragments de

celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Selon l'invention dans un mode de réalisation différent le nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon comprend au moins une séquence choisie parmi SEQ ID NO 98 à 104, SEQ ID NO 59, SEQ ID NO 98, SEQ ID NO 56 à SEQ ID NO 58, SEQ ID NO 76 à SEQ ID NO 96 et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Selon l'invention dans un mode de réalisation différent le nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon comprend au moins une séquence comprise entre choisie parmi SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO 45, SEQ ID NO 65 et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Ces fragments nucléotidiques, dite séquences d'identification selon l'invention permettent le dosage sélectif d'un microorganisme en présence d'au moins 2 autres microorganismes choisis parmi les microorganismes suivants :

*Escherichia coli, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Enterococcus durans, Enterococcus hirae, Streptococcus bovis, Streptococcus equinus, Clostridium perfringens, Genre Salmonella, Staphylococcus aureus, Enterovirus : virus de la poliomyélite, virus coxsackie A et B, Echovirus, Genre Cryptosporidium, Cryptosporidium parvum, Giardia lamblia, Genre Legionella, Legionella pneumophila, Aeromonas hydrophila, Aeromonas caviae, Aeromonas sobria, Campylobacter coli, Campylobacter jejuni, Virus de l'hépatite A, Calicivirus : Norwalk et Sapporo Virus, Adenovirus, Rotavirus, Pseudomonas aeruginosa, Vibrio cholerae, Genre Mycobactérium, Mycobacterium avium, Mycobacterium intracellulare, Mycobacterium simiae, Mycobacterium kansasii, Mycobacterium xenopi, Mycobacterium marinum, Mycobacterium gordonae, Acinetobacter baumanii, Staphylococcus epidermidis, Burkholderia gladioli, Burkholderia cepacia, Stenotrophomonas maltophilia, Astrovirus.*

*Les Adenovirus, tel que Adeno virus 40, Adeno virus 41bis;*

les *Astrovirus*, *HastV-1-2* ;  
les *Enterovirus*, tels que *Poliovirus*, *Coxsackievirus*, *Echovirus*,  
les *Rotavirus*,  
les *Calicivirus*, tels que *Virus de Norwalk*, *Virus de Sapporo*, et  
5 les virus de l'*Hépatite*, tel que l'*Hépatite A*,  
le genre *Cryptosporidium*, tels que *Cryptosporidium parvum*,  
*Giardia lamblia* et les *Microsporidies*.

Dans un autre mode de réalisation ces séquences d'identification selon l'invention permettent le dosage sélectif d'un microorganisme en 10 présence d'au moins 2 autres microorganismes choisis parmi les microorganismes suivants :

*Escherichia coli*, Genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*

Dans un autre mode de réalisation ces séquences d'identification selon l'invention permettent le dosage sélectif d'un microorganisme en 15 présence d'au moins 2 autres microorganismes choisis parmi les microorganismes suivants :

*Escherichia coli*, genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*,  
*Clostridium perfringens*.

Dans un autre mode de réalisation ces séquences d'identification 20 selon l'invention permettent le dosage sélectif d'un microorganisme en présence d'au moins 2 autres microorganismes choisis parmi les microorganismes suivants :

*Escherichia coli*, genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, Genre  
*Cryptosporidium*

Dans un autre mode de réalisation ces séquences d'identification 25 selon l'invention permettent le dosage sélectif d'un microorganisme en présence d'au moins 2 autres microorganismes choisis parmi les microorganismes suivants :

*Escherichia coli*, *Enterovirus* et Genre *Cryptosporidium*.

Dans un autre mode de réalisation ces séquences d'identification 30 selon l'invention permettent le dosage sélectif d'un microorganisme en présence d'au moins 2 autres microorganismes choisis parmi les microorganismes suivants :

*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*,  
35 *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Clostridium perfringens*, Genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*,

*Enterovirus : virus de la poliomyélite, virus coxsackie A et B, Echovirus, Genre Cryptosporidium, Cryptosporidium parvum, Giardia lamblia,*

Dans un autre mode de réalisation ces séquences d'identification selon l'invention permettent le dosage sélectif d'un microorganisme en 5 présence d'au moins 2 autres microorganismes choisis parmi les microorganismes suivants :

*Escherichia coli, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Enterococcus durans, Enterococcus hirae, Streptococcus bovis, Streptococcus equinus, Clostridium perfringens, Genre Salmonella, Staphylococcus aureus, 10 Enterovirus : virus de la poliomyélite, virus coxsackie A et B, Echovirus, Genre Cryptosporidium, Cryptosporidium parvum, Giardia lamblia, Genre Legionella, Legionella pneumophila, Aeromonas hydrophila, Aeromonas caviae, Aeromonas sobria, Campylobacter coli, Campylobacter jejuni, Virus de l'hépatite A, Calicivirus : Norwalk et Sapporo Virus, Adenovirus, Rotavirus.*

15 Dans un autre mode de réalisation ces séquences d'identification selon l'invention permettent le dosage sélectif d'un microorganisme en présence d'au moins 2 autres microorganismes choisis parmi les microorganismes suivants :

*Escherichia coli, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Enterococcus durans, Enterococcus hirae, Streptococcus bovis, Streptococcus equinus, Clostridium perfringens, Genre Salmonella, Staphylococcus aureus, 20 Enterovirus : virus de la poliomyélite, virus coxsackie A et B, Echovirus, Genre Cryptosporidium, Cryptosporidium parvum, Giardia lamblia, Genre Legionella, Legionella pneumophila, Aeromonas hydrophila, Aeromonas caviae, Aeromonas sobria, Campylobacter coli, Campylobacter jejuni, Virus de l'hépatite A, Calicivirus : Norwalk et Sapporo Virus, Adenovirus, Rotavirus, Pseudomonas aeruginosa, Vibrio cholerae, Genre Mycobactéries, Mycobacterium avium, Mycobacterium intracellulare, Mycobacterium simiae, Mycobacterium kansasii, Mycobacterium xenopi, Mycobacterium marinum, 25 Mycobacterium gordoneae, Acinetobacter baumanii, Staphylococcus epidermidis, Burkholderia gladioli, Burkholderia cepacia, Stenotrophomonas maltophilia, Astrovirus.*

30 On pourra également concevoir et utiliser un nécessaire de détermination microbiologique selon l'invention comportant des séquences d'identification pour identifier des microorganismes au niveau des sérotypes, des sous-types et en épidémiologie.

Le procédé d'analyse d'un échantillon susceptible de contenir au moins une bactérie, parasite et/ou virus, selon l'invention utilise un mélange de séquences nucléotidiques comme sondes d'identification spécifiques d'un sérotype, d'un sous-type, d'une espèce ou au moins un genre de bactérie, 5 virus et/ou parasite susceptible d'être présent dans l'échantillon.

Ce procédé d'analyse d'un échantillon selon l'invention est caractérisé par une étape de détection comprenant la mise en œuvre d'un nécessaire de détermination microbiologique tel que défini précédemment.

Dans un mode préférentiel d'exécution préalablement à l'étape de 10 détection, on peut effectuer au moins une étape de lyse.

Dans un autre mode d'exécution, postérieurement à cette étape de lyse, on effectue une étape d'amplification.

L'invention concerne également un procédé de contrôle d'un échantillon liquide dans lequel préalablement à toute étape de détection une 15 étape d'enrichissement en microorganismes dudit échantillon est effectuée.

Cette étape d'enrichissement peut être effectuée par filtration notamment en utilisant un moyen de filtration comprenant des fibres creuses et utilisé en mode frontal permettant d'obtenir dans un temps limité, à partir d'un échantillon liquide de départ de volume important et prédéterminé, un 20 échantillon à analyser d'un volume suffisamment faible, tout en garantissant la viabilité des microorganismes, pour que les techniques d'analyse, notamment la multidétection selon l'invention, puissent être ensuite mises en œuvre.

Ce moyen de filtration est basé sur la technique de l'ultrafiltration sur fibres creuses en mode frontal.

Par mode frontal, par opposition au mode tangentiel, on entend tout passage en une passe d'un échantillon liquide de départ dans le moyen de filtration, sans recyclage d'au moins une partie du même échantillon à l'entrée dudit moyen de filtration.

L'utilisation de ce moyen d'ultrafiltration en mode frontal permet 30 d'obtenir des concentrats de volume faible, d'effectuer la concentration d'un prélèvement dans une échelle de temps de l'ordre de l'heure au plus en un seul passage, tout en garantissant la viabilité des microorganismes, la multi-récupération et des rendements de l'ordre de 100 %.

Par multi-récupération, on entend la possibilité de récupérer dans 35 l'échantillon final pratiquement tous les différents genres ou espèces de microorganismes présents dans l'échantillon de départ.

Ces rendements élevés sont obtenus en raison de l'inexistence de volumes, dits volumes morts, dus par exemple sur d'autres dispositifs à la présence de tuyauteries annexes, par exemple de recyclage, et par la fiabilité de la porosité sur toute la longueur de la fibre creuse.

5 Le procédé de contrôle selon l'invention, est ainsi appliqué sur un échantillon obtenu éventuellement par filtration, d'un volume compris entre 1 ml et 100 litres.

Une étape de lyse des microorganismes est effectuée, soit par lyse mécanique soit par lyse chimique, telles que décrites précédemment.

10 Une étape de purification est éventuellement appliquée, en utilisant éventuellement les techniques de capture par des oligonucléotides fixés sur des particules magnétiques, ou par utilisation de colonnes de silice, de particules de silice (inerte ou magnétique), de colonnes échangeuses d'ions, ou de toute autre méthode citée précédemment.

15 Une étape d'amplification enzymatique est éventuellement appliquée également en utilisant préférentiellement les techniques de transcription telles que TMA, NASBA, mais en utilisant en particulier les techniques de PCR et RT-PCR.

Une étape de marquage de l'amplicon est appliquée, par utilisation 20 préférentielle d'un marqueur fluorescent.

Une étape d'hybridation est ensuite appliquée, en utilisant préférentiellement les sondes d'identification spécifiques ou leurs fragments fixés sur un support solide, et en particulier en utilisant une biopuce.

25 Le procédé de contrôle et le nécessaire de détermination microbiologique selon l'invention utilisant ces séquences spécifiques permet de détecter simultanément un bactérie et/ou un virus et/ou un parasite d'un panel fixe en une seule étape de multidétection finale.

En fonction des liquides à analyser des panels fixes de microorganismes peuvent être facilement définis.

30 Un autre objet de l'invention est un procédé de production et/ou désinfection d'un liquide, caractérisé en ce qu'il comprend une étape d'analyse mettant en œuvre un nécessaire de détermination microbiologique selon l'une quelconque des revendications de 35 à 48 et générant un algorithme d'interprétation des données permettant l'asservissement dudit procédé de production et/ou désinfection auxdites données générées par le nécessaire de détermination microbiologique.

35

Les avantages de l'invention et les techniques mises en œuvre sont illustrés par les exemples non limitatifs et les figures en annexe.

5           **La figure 1** représente l'évolution du base-call sur les sondes spécifiques d'*Escherichia coli* et d'*Acinetobacter baumanii* en fonction du nombre de copies d'ARNr de chacun des partenaires ajoutées avant amplification.

10          La zone encadrée dans le graphique représente les proportions *E. coli/A. baumanii* à partir desquelles les cibles *E. coli* sont interprétables par la puce.

15          **La figure 2** représente l'évolution du base-call sur les sondes spécifiques d'*E. coli*, *S. typhimurium* et *A. baumanii* en fonction des proportions du nombre de copies de transcripts marqués représentant les 3 espèces.

20          Dans les exemples ci-dessous décrits les souches utilisées sont :  
*Escherichia coli* ATCC 11775  
*Enterococcus faecalis* 19433T  
*Salmonella typhimurium* API 9810059  
*Acinetobacter baumanii* ATCC 19606

25          **Exemple 1 : Détection et identification d'une seule cellule bactérienne en culture : cas d'*Escherichia coli* (gram -) et d'*Enterococcus faecalis* (gram +)**

30          a) Préparation de la culture

On cultive une souche d'*E. coli* ou *E. faecalis* à 37°C dans 2 ml de bouillon Luria Bertani. Lorsque la culture a atteint une densité optique à 620 nanomètres de 0,2, on prélève 1ml. ( $10^8$  bactéries/ml). On réalise des dilutions en série, jusqu'à avoir 0,1cellule/ $\mu$ l.

35          b) Extraction et purification des acides nucléiques

1. Lyse des microorganismes

De la suspension à 0,1 cellules par microlitres, 10 $\mu$ l sont prélevés (1 cellule). Sur cette suspension, on ajoute 100 $\mu$ l d'un tampon de lyse contenant du Tris 10mM, de l'EDTA 1mM (dilution d'une solution TE100X commercialisée chez SIGMA, ref. T-9285) et du lyzozyme (Sigma, ref. L-6876) dont la concentration est différente selon le Gram de la bactérie : 3 mg/ml pour

*E. faecalis*, 400 µg/ml pour *E. coli*. La lyse des bactéries s'effectue en laissant le tube contenant la suspension bactérienne en contact avec le tampon de lyse durant 5 à 10mn à température ambiante.

2. Extraction et purification des acides nucléiques.

5 Cette étape s'effectue en utilisant le kit Rneasy mini kit commercialisé par Qiagen (ref. 74104) selon le protocole recommandé pour l'extraction et la purification des ARN totaux bactériens.

c) RT-PCR

10 Les deux étapes de RT et PCR vont s'effectuer l'un après l'autre, dans un seul tube, en utilisant le kit ACCESS (ref A1250, Promega).

Pour cela, on ajoute à 25µl de la suspension d'ARN total le tampon 5X AMV/Tfl, 1mM de MgSO<sub>4</sub>, 200µM de dNTPs (deoxyribonucleosides triphosphates), 5U d'AMV RT polymérase, 5U de Tfl polymérase, 5U de 15 RNAsin (Pranega ref. NZIII), 0.5µM des amorces eubactériennes A1.1 et S9T7 :

5'gaggcagcagtggggat3'

5'taatacgactcaatagggaggaggattaccagggtatctaatt3' (en gras : promoteur de la polymérase T7),

20 afin d'obtenir 50µl de volume réactionnel final.

Pour l'étape de RT, le mélange est mis à incuber 45mn à 48°C, puis 5mn à 94°C. Pour l'étape de PCR on réalise ensuite 35 cycles composés chacun des 3 étapes suivantes : 94°C 1mn, 55°C 1mn, 68°C 1mn. Une extension finale de 7mn à 68°C est ensuite réalisée.

25 d) Vérification de l'amplification

On dépose 5µl de produit d'amplification (amplicon) sur un gel d'agarose 1,5% dans de l'EDTA-Tris Borate. Après une migration de 20mn à 200V, on visualise la bande d'amplification par coloration au Bromure d'Ethidium et par illumination aux UV. On montre que l'amplification est positive 30 par la présence d'une bande ayant la taille attendue (450 paires de bases).

e) Identification de l'amplicon sur une puce à ADN (Affymetrix, Santa Clara)

Une biopuce est synthétisée sur un support solide en verre selon le procédé décrit dans le brevet US 5 744 305 (Affymetrix, Fodor et al) en utilisant 35 la stratégie de reséquençage décrite dans la demande WO 95/11995 (Affymax, Chee et al) et selon la méthode décrite par A Troesch et al. dans J. Clin.

Microbiol., vol. 37(1), p 49-55, 1999 avec les variantes suivantes : les oligonucléotides synthétisés sur la puce réalisent le reséquençage des séquences d'identification. Ce procédé permet de diminuer le nombre total d'oligonucléotides synthétisés et donc présentent un avantage considérable en  
5 terme de coût de production et sans compromis sur la qualité de l'identification des différents microorganismes de part le choix de ces séquences d'identification . Les oligonucléotides comportent 20 bases, avec une position d'interrogation en 12<sup>ème</sup> position par rapport à l'extrémité 3' de la séquence. Pour les espèces *E. coli* et *E. faecalis*, il y a également des oligonucléotides de  
10 17 bases, avec 2 positions d'interrogations : une en 10 et une en 8<sup>ème</sup> position. D'autres oligonucléotides ont des longueurs comprises entre 10 et 25 nucléotides. Les positions d'interrogation varient alors en fonction de la longueur de l'oligonucléotide.

L'analyse est effectuée sur le système complet GeneChip®  
15 (référence 900228, Affymetrix, Santa Clara, CA) qui comprend le lecteur GeneArray®, le four d'hybridation GeneChip®, la station fluidique GeneChip® et le logiciel d'analyse GeneChip®.

#### 1. Transcription et marquage des amplicons.

Grâce à l'amorce antisens S9T7, tous les produits d'amplifications  
20 présentent un promoteur pour la RNA polymérase T7. Ces amplicons vont alors servir de matrice à une réaction de transcription au cours de laquelle sera incorporé un ribonucléotide fluorescent.

A partir des 50µl de produit d'amplification positif, un aliquot (entre 2 et 12µl) est prélevé et ajouté à un mélange de transcription contenant les  
25 composants du kit Megascript T7 d'Ambion (ref. 1334) et de fluorescein-12-UTP (Roche, ref. 1427857). Le mélange réactionnel final se fait dans 20µl et la réaction de transcription s'effectue pendant 2 heures à 37°C.

#### 2. Fragmentation des transcripts marqués

Afin d'améliorer les conditions d'hybridation, les transcripts  
30 marqués sont clivés en fragments d'environ 20 nucéotides. Pour cela, les 20µl de transcripts marqués sont soumis à l'action de l'imidazole (SIGMA) 30mM et du chlorure de manganèse (Merck) 30mM pendant 30mn à 65°C.

#### 3. Hybridation sur la puce de recherche

A partir des 20µl de transcripts marqués et fragmentés un aliquot  
35 de 5µl est prélevé et ajouté à 700µl de tampon d'hybridation dont la composition est de SSPE 6X (Eurobio), DTAB 5mM (Sigma), Triton 0.5% (Merk

eurolab). Ce mélange est hybridé sur la puce dans les conditions suivantes : 40 mn à 45°C. Après lavage, la puce est scannée, puis l'image d'hybridation obtenue est analysée par le logiciel Genechip® (Affymetrix, Santa Clara) Les spots d'hybridation permettent de reconstituer la séquence de l'amplicon, qui ensuite comparée aux séquences de références de la puce. La séquence (et donc l'espèce qui lui correspond) qui présente le meilleur pourcentage d'homologie (base-call, en %) avec la séquence de l'amplicon est retenue pour l'identification.

#### 4. Interprétation des résultats.

Seule une partie de la séquence de 450 bases est analysée. Elle correspond à tout ou partie des sondes d'identification représentées sur la biopuce. Le seuil d'interprétation, c'est à dire niveau d'identification est fixé à au moins 70% de base-call sur la séquence d'identification. En dessous de ce seuil, la cible n'est pas identifiée.

15

#### Résultats

L'ARN extrait d'une seule cellule bactérienne (*E. coli* ou *E. faecalis*) donne lieu à un produit d'amplification, puis à une identification correcte sur la biopuce.

20

#### **Exemple 2 : Discrimination de mélanges de 2 espèces bactériennes différentes.**

Dans cet exemple, la RT-PCR eubactérienne a été appliquées à des cibles synthétiques. C'est à dire que ces cibles proviennent de l'amplification, puis de la transcription de l'ADN ribosomal 16S dans son entier. Ces cibles sont appelées transcripts in-vitro. Dans cet exemple, la cible est un mélange de transcripts in-vitro représentant les espèces *Escherichia coli* et *Acinetobacter baumanii*. Quand on ajoute la cible au tube de RT-PCR, on ne résonne plus en terme de nombre de bactéries, mais de nombre de copies de transcripts in-vitro, puis en nombre d'équivalents-bactéries, en partant du postulat suivant : 1 bactérie correspond à  $10^4$  copies d'ARN ribosomal 16S.

Pour cela, les transcripts ont été dosés à  $10^{11}$  copies / µl. Pour *Acinetobacter baumanii*, la dilution  $10^8$  copies/µl est préparée. Pour *Escherichia coli*, les dilutions  $10^3$ /µl,  $10^4$ /µl,  $10^5$ /µl et  $10^6$ /µl sont préparées. Le conditions du mélange réactionnel pour la RT-PCR sont identiques à celles décrites dans

l'exemple 1, paragraphe c), sauf que le volume de cible n'est plus 25µl d'une suspension d'ARN total, mais 2µl d'un mélange constitué de 1µl de chaque dilution de transcript représentant chaque espèce dans les proportions suivantes :

5

Équivalents bactériens <i>E. coli/A. baumanii</i>	0/0	0,1/10 <sup>4</sup>	1/10 <sup>4</sup>	10/10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup> /10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup> /0
Copies de transcripts d' <i>E. coli</i>	0	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>
Copies de transcripts d' <i>A. baumanii</i>	0	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	0

L'unique amplicon obtenu est ensuite traité selon l'étape e) de l'exemple 1.

10

### Résultats

La figure 1 montre qu'en ramenant le nombre de copies d'ARN<sub>16S</sub> à un nombre de bactéries, il est donc possible de détecter, par utilisation de la puce à ADN, l'équivalent de 1 *E. coli* en présence de 10<sup>4</sup> *A. baumanii*, soit une proportion de 0.01%.

15

### Exemple 3 : Discrimination d'un mélange de 3 espèces bactériennes différentes

20

Des transcripts marqués de 3 espèces bactériennes (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Acinetobacter baumanii*) sont obtenus selon le protocole e) à f.1. Ils sont ensuite purifiés à l'aide du kit Rneasy mini kit (Qiagen, ref. 74104) selon le protocole adapté à la purification de transcripts in vitro. Les transcripts marqués sont dosés (lecture à 260nm sur un spectrophotomètre) de manière à connaître le nombre de cibles (ou copies) introduites dans le mélange d'hybridation. Le nombre total de copies dans un mélange d'hybridation est fixé à 10<sup>13</sup> copies.

Les transcripts correspondant aux espèces *E. coli* et *S. typhimurium* sont en même nombre de copies. Ces transcripts ont été rajoutés par rapports aux transcripts d'*A. baumanii* de la façon suivante :

30

Proportion de <i>E. coli – S. typhimurium</i> / <i>A. baumanii</i>	0.01%	0.1%	1%	10%	20%	50%
Nbre de copies de transcripts <i>E. coli</i>	5.10 <sup>9</sup>	5.10 <sup>9</sup>	5.10 <sup>10</sup>	5.10 <sup>11</sup>	10 <sup>12</sup>	2,5.10 <sup>12</sup>

Nbre de copies de transcripts <i>S. typhimurium</i>	$5.10^8$	$5.10^9$	$5.10^{10}$	$5.10^{11}$	$10^{12}$	$2.5.10^{12}$
Nbre de copies de transcripts <i>A. baumanii</i>	$10^{13}$	$10^{13}$	$10^{13}$	$10^{13}$	$8.10^{12}$	$5.10^{12}$

### Résultats

La figure 2 montre que la détection d'*E. coli* se fait à des proportions plus faibles (1%) que celle de *S. typhimurium* (10%). Ce résultat  
 5 montre qu'il est possible de détecter sur la puce 3 espèces bactériennes différentes.

### Exemple 4 : détection simultanée d'*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella enteritidis*

10

#### a) Préparation des suspensions bactériennes

Souches testées :

*Escherichia coli* ATCC 11775T

15

*Staphylococcus aureus* ATCC 12600T

*Salmonella enteritidis* ATCC 13076

Les souches sont cultivées dans un bouillon Trypcase Soja à 37°C.  
 Lorsque la culture atteint une densité optique de 0.2-0.3 ( $10^8$  bactéries/ml), on  
 20 réalise des dilutions en cascade de 1/10<sup>ème</sup>, jusqu'à atteindre 100 bactérie/ml.

25

#### b) Mélange des bactéries

On mélange les 3 espèces bactériennes en utilisant les suspensions produites dans la partie a), de manière à avoir : 100 *Escherichia coli*, 100 *Staphylococcus aureus* et 100 *Salmonella enteritidis*.

#### c) Obtention des ARN totaux

##### 1. Lyse des microorganismes

Le volume final sera de 100µl. On rajoute 1µl de tampon TE100X  
 30 (Sigma ref-T-9285), du lysozyme à 100mg/ml (Sigma, Ref.L-6876) pour avoir une concentration finale de 10mg/ml. On complète ou non avec de l'eau (Sigma, ref. W-4502) pour avoir 100µl. On incube 30 min à 25°C.

##### 2. Purification des acides nucléiques

On utilise ensuite le RNeasy Mini Kit (Qiagen, ref 74104) en appliquant le protocole préconisé par Qiagen pour les bactéries.

d) RT-PCR

5 On effectue une RT-PCR en utilisant le kit ACCESS (Promega, ref. A1250) selon le protocole indiqué Exemple 1, partie c).

e) Vérification de l'amplification

Selon le protocole indiqué Exemple 1, partie d).

10

f) Analyse sur une biopuce

1. Transcription et marquage des amplicons

Selon le protocole indiqué Exemple 1, partie e)-1.

15

2. Fragmentation des transcripts marqués

Selon le protocole indiqué Exemple 1, partie e)-2.

3. Hybridation sur la puce

20 Selon le protocole indiqué Exemple 1, partie e)-3

4. Interprétation des résultats

Le base-call sur la séquence d'identification correspondant à chacun des taxons doit être supérieur à 90%. En dessous la cible n'est pas identifiée.

25 **Résultats**

Espèce testée	Base-call sur la séquence d'identification correspondante
Escherichia coli	100%
Staphylococcus aureus	100%
Salmonella enteritidis	100%

30

Conclusion

Il y a eu détection simultanée des 3 espèces bactériennes par hybridation sur les séquences d'identification correspondantes

Exemple 5 : détection simultanée d'*Escherichia coli*,  
5 *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* et *Pseudomonas aeruginosa*

a) Préparation des suspensions bactériennes

10 Souches testées :  
*Escherichia coli* ATCC 11775T  
*Staphylococcus aureus* ATCC 12600T  
*Salmonella enteritidis* ATCC 13076  
15 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145T

15 Les suspensions bactériennes sont préparées selon le protocole indiqué Exemple 4, partie a)

b) Mélange des bactéries

20 On mélange les 4 espèces bactériennes en utilisant les suspensions produites dans la partie a), de manière à avoir : 100 *Escherichia coli*, 100 *Staphylococcus aureus*, 100 *Salmonella enteritidis* et 100 *Pseudomonas aeruginosa*.

25 c) Obtention des ARN totaux

Selon les protocoles indiqué Exemple 4, partie c)

d) RT-PCR

On effectue une RT-PCR en utilisant le kit ACCESS (Promega, ref. 30 A1250) selon le protocole indiqué Exemple 1, partie c).

e) Vérification de l'amplification

Selon le protocole indiqué Exemple 1, partie d).

35 f) Analyse sur une biopuce

1. Transcription et marquage des amplicons

Selon le protocole indiqué Exemple 1, partie e)-1.

2. Fragmentation des transcripts marqués

Selon le protocole indiqué Exemple 1, partie e)-2.

3. Hybridation sur la puce

5 Selon le protocole indiqué Exemple 1, partie e)-3

4. Interprétation des résultats

Le base-call sur la séquence d'identification de chacun des taxons doit être supérieur à 90%. En dessous la cible n'est pas identifiée.

## 10 Résultat

Espèce testée	Base-call sur la séquence d'identification correspondante
Escherichia coli	100%
Staphylococcus aureus	91,9%
Salmonella enteritidis	100%
Pseudomonas aeruginosa	100%

## Conclusion

15 Il y a eu détection simultanée des 4 espèces bactériennes par hybridation sur les séquences d'identification correspondantes

20 **Exemple 6 : Détection simultanée d'Escherichia coli, Cryptosporidium parvum et du Poliovirus Sabin 3.**

a) Préparation des suspensions.

Pour Escherichia coli, les dilutions sont effectuées comme indiqué Ex 4 , a).

25 Pour Cryptosporidium parvum, des dilutions en cascades sont effectuées à partir d'une suspension d'oocystes titrée à  $10^7$ /ml, commercialisée par Waterborne Inc. (St Louis, USA).

Pour le Poliovirus Sabin 3 on utilise une suspension titrée à  $10^9$  PFU/ml

30

b) Mélange des microorganismes.

On mélange 3000 E. coli, 3000 C. parvum et 3000 cfu du Poliovirus de manière à obtenir 300 µl de volume final.

c) Préparation des acides nucléiques

5 Les 300µl sont séparés en 3X100 µl, car l'extraction et la purification des ARN subissent 3 processus séparés.

1. Escherichia coli

Préparation des ARN totaux selon le protocole indiqué EX 4, partie c)

10 2. Cryptosporidium parvum

On utilise le kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, ref. 74104) selon un protocole modifié. Pour cela, on ajoute aux 100µl 350 µl de tampon de lyse RLT du kit RNeasy, et 25 µl de Protéinase K à 19 mg/ml (Roche, ref. 1964372) ce qui ramène à 1 mg/ml. On laisse agir 30 mn à 65°C.

15 On continue ensuite selon le protocole RNeasy Mini Kit "for bacteria".

3. Pour Poliovirus Sabin 3

On rajoute 40µl d'eau (Sigma, ref. W-4502) aux 100µl, et on utilise le QIamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, ref. 52906), selon les instructions du fournisseur.

d) Amplification par RT-PCR

1. Escherichia coli

25 On effectue une RT-PCR en utilisant le kit ACCESS (Promega, ref. A1250) selon le protocole indiqué Exemple 1, partie c).

2. Cryptosporidium parvum

On effectue une RT-PCR en utilisant le kit ACCESS (Promega, ref. A1250).

30 Pour cela, on ajoute aux 25µl d'ARN total obtenu à l'étape b) 2, 25µl de mélange réactionnel de manière à avoir, dans les 50µl final : le tampon AMV/Tfl 1X, le MgSO<sub>4</sub> 2,5 mM, les dNTP 200 µM, 5U de Tfl, 5U d'AMV, 5U de RNAsin (Promega ref. N2111), et les primers XIA2F et XIA2R 200pM.

35 XIA2F 5' GGAAGGGTTGTATTATTAGATAAAG 3'

XIA2R-T7 5'  
**taatacgactcaactatagggaggaggattaAAGGAGTAAGGAACAAACCTCCA 3'**

Tirés de la publi de Xiao et al. dans Applied and Environmental Microbiology, 1999

5 (en gras : promoteur T7 de la polymérase T7, qui sera utilisé lors de la transcription)

Pour l'étape de RT, le mélange est mis à incuber 45 mn à 48°C.  
Pour l'étape PCR on incube 5 mn à 94°C, puis on réalise 30 cycles composés  
10 chacun des 3 étapes suivantes : 94°C 45 sec, 55°C 45 sec, 68°C 1 mn. Une extension finale de 7 mn à 68°C est ensuite réalisée.

### 3. Poliovirus Sabin 3

On effectue une RT-PCR en utilisant le kit ACCESS (Promega, ref. A1250).

15 Pour cela, on ajoute aux 25µl d'ARN total obtenu à l'étape b) 2, 25µl de mélange réactionnel de manière à avoir, dans les 50µl final : le tampon AMV/Tfl 1X, le MgSO<sub>4</sub> 2 mM, les dNTP 300 µM, 5U de Tfl, 5U d'AMV, 5U de RNAsin (Promega ref. N2111), et les primers spécifiques 200pM.

20 Pour l'étape de RT, le mélange est mis à incuber 45 mn à 48°C.  
Pour l'étape PCR on incube 2 mn à 94°C, puis on réalise 40 cycles composés chacun des 3 étapes suivantes : 94°C 15 sec, 55°C 30 sec, 68°C 1 mn. Une extension finale de 7 mn à 68°C est ensuite réalisée.

25 e) Vérification de l'amplification

Selon le protocole indiqué Exemple 1, partie d).

### f) Analyse sur une biopuce

30 1. Transcription et marquage des amplicons

Selon le protocole indiqué Exemple 1, partie e)-1.

2. Purification des transcripts marqués.

Les 3 tubes contenant les 20µl de transcription sont rassemblés la purification se fait en utilisant le RNeasy Mini Kit (Qiagen ref. 74104), protocole  
35 pour la purification de transcripts in-vitro. On obtient 20µl de transcript

3. Fragmentation des transcripts marqués et purifiés.

Selon le protocole indiqué Exemple 1, partie e)-2.

**3. Hybridation sur la puce**

Selon le protocole indiqué Exemple 1, partie e)-3

5

**4. Interprétation des résultats**

Le base-call sur la séquence signature d'*E. coli* et *C. parvum* doit être supérieur à 90%. Pour le Poliovirus 3, en raison d'un polymorphisme de séquence le seuil de détection se situe au dessus de 85%

10

**Résultat**

Espèce testée	Base-call sur la séquence d'identification correspondante
<i>Escherichia coli</i>	100%
<i>Cryptosporidium parvum</i>	100%
Poliovirus Sabin 3	88,9%

15

**Conclusion**

Il y a eu détection simultanée des 3 paramètres par hybridation sur les séquences d'identification correspondantes

20

**Exemple 7 : détection simultanée d'un Entérovirus (Coxsackievirus A9) et du virus de l'Hépatite A.**

25

**1- Cibles considérées :**

Souche de Coxsackievirus A9 à 7 TCID<sub>50</sub>/μL (extraction des acides nucléiques par utilisation du kit Qiamp Viral RNA de Qiagen -ref. 52904 -selon les indications du fournisseur)

30

Souche vaccinale du virus de l'Hépatite A à 17.5 DICC<sub>50</sub>/μL (extraction des acides nucléiques par utilisation du kit Qiamp Viral RNA de Qiagen -ref. 52904- selon les indications du fournisseur)

## 2- RT-PCR multiplex

On effectue une RT-PCR en utilisant le kit ACCESS (Promega, ref.

A1250)

Pour cela, on ajoute 1µL de chaque souche virale et 48µL de milieu réactionnel de façon de la manière suivante :

	Concentration finale/tube
RNasine	2.5 U
Tampon 5X	1X
dNTP	0.3mM
Primers H1 +H2 <sup>(a)</sup>	0.5µM
Primers Enterovirus <sup>(b)</sup>	0.3µM
MgSO4	2 mM
T4 gene 32 protein	2.5µg
AMV	5U
Tfl	5U

(a) : publication Robertson et al., Virus Research, 1989, 13, 207-

212

10 (b) : désignés dans la région 5'NCR

Pour l'étape de rétro-transcription, le mélange est incubé 45 minutes à 48°C. Après une étapes de dénaturation de 2 minutes à 94°C, les ADN complémentaires obtenus sont amplifiés selon les modalités suivantes :  
15 45 cycles de [15 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C, 45 secondes à 68°C] avec une étape d'elongation de 7 minutes.

## 3- Vérification de l'amplification

20 On dépose 8µL de produits de RT-PCR sur un gel de 1.5% d'agarose dans de l'EDTA-Tris-Borate. Après une migration de 30 minutes sous 100 V, on visualise des produits d'amplification par coloration du gel par du Bromure d'Ethidium et par illumination U.V.. La visualisation d'une bande vers 500bp (entérovirus) et d'une autre à 249bp (HAV) montrent que  
25 l'amplification est effective.

**Analyse sur une biopuce**

Le marquage des produits d'amplification s'effectue selon le brevet WO99/65926.

5

**Interprétation des résultats & conclusions**

Le base-call sur la séquence correspondante à chaque virus doit être supérieur à 95%. En dessous de ce seuil, la cible n'est pas identifiée.

10

On obtient les résultats suivants :

	% Base-Call
Coxsackievirus A9	96.7
HAV	96.9

**Conclusion**

15

Il y a eu détection simultanée des 2 souches virale par hybridation sur les séquences d'identification correspondantes.

## REVENDICATIONS

1/ Procédé de contrôle de la qualité microbiologique d'un milieu aqueux environnemental, susceptible de comporter différents micro-  
5 organismes, caractérisé en ce que :

- on choisit un ensemble de référence, constitué d'au moins trois micro-organismes, représentatifs, ensemble ou séparément, d'un niveau de qualité microbiologique,
- 10 - on dispose d'un nécessaire de détermination microbiologique, constitué d'au moins trois sondes d'identification respectivement spécifiques desdits trois microorganismes,
- après traitement du milieu à analyser, on met lesdits microorganismes, ou toute fraction obtenue à partir de ces derniers, en contact avec ledit nécessaire de détermination, moyennant quoi on multi-détermine  
15 lesdits microorganismes,
- cette détermination étant représentative du niveau de qualité microbiologique du milieu.

2/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le nécessaire de détermination microbiologique comprend au moins une sonde  
20 d'identification spécifique à une bactérie, au moins une sonde d'identification spécifique à un parasite et au moins une sonde d'identification spécifique à un virus.

25 3/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le nécessaire de détermination microbiologique comprend au moins quatre sondes d'identification spécifiques à au moins quatre bactéries différentes.

4/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le nécessaire de détermination microbiologique comprend au moins cinq sondes d'identification spécifiques à au moins cinq virus différents.

30 5/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le nécessaire de détermination microbiologique comprend au moins deux sondes d'identification spécifiques à au moins deux parasites.

35 6/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le nécessaire de détermination microbiologique comprend au moins une sonde d'identification spécifique à une bactérie et au moins une sonde d'identification spécifique à au moins un parasite.

7/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1, 2, 3 et 6, caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les bactéries suivantes :

5           *Escherichia coli, genre Salmonella, Staphylococcus aureus.*

8/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1,2,3 et 6, caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les bactéries suivantes :

10          *Escherichia coli, genre Salmonella, Staphylococcus aureus, Clostridium perfringens.*

9/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1,2,3 et 6, caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les bactéries suivantes :

15          *Escherichia coli, Escherichia coli SEROTYPE 0157:H7, Helicobacter pylori, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Enterococcus durans, Enterococcus hirae, Streptococcus bovis, Streptococcus equinus, Clostridium perfringens, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus aureus, Campylobacter coli, Campylobacter jejuni, Aeromonas hydrophila, Aeromonas caviae, Aeromonas sobria, Pseudomonas aeruginosa, Vibrio cholerae, Acinetobacter baumanii, Burkholderia gladioli, Burkholderia cepacia, Stenotrophomonas maltophilia, le genre Mycobactéries, Mycobacterium avium, Mycobacterium intracellulare, Mycobacterium simiae, Mycobacterium kansasii, Mycobacterium xenopi, Mycobacterium marinum, Mycobacterium gordonae, le genre Legionella, Legionella pneumophila, le genre Salmonella.*

10/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1, 2, 3, 5 et 6, caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les microorganismes suivants : *Escherichia coli, genre Salmonella, Staphylococcus aureus, Genre Cryptosporidium.*

11/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1, 2, 3, 5 et 6, caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les microorganismes suivants : *genre Salmonella, Staphylococcus aureus, Gardia lamblia, Cryptosporidium parvum.*

12/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1, 2, 3, 5 et 6, caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les microorganismes

suivants : *Escherichia coli*, *Escherichia coli* sérotype 0157 :H7, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Clostridium perfringens*, Genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Enterovirus*: virus de la poliomyélite, virus coxsackie A et B, *Echovirus*, Genre *Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, genre *Giardia*, *Giardia lamblia*.

5 13/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les microorganismes suivants :

10 *Escherichia coli*, *Escherichia coli* sérotype 0157 :H7, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Clostridium perfringens*, Genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Enterovirus*: virus de la poliomyélite, virus coxsackie A et B, *Echovirus*, Genre *Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*,  
15 genre *Giardia*, *Giardia lamblia*, Genre *Legionella*, *Legionella pneumophila*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, Virus de l'hépatite A, *Calicivirus* : Norwalk et *Sapporo Virus*, *Adenovirus*, *Rotavirus*.

20 14/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les microorganismes suivants :

25 *Escherichia coli*, *Escherichia coli* sérotype 0157 :H7, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Clostridium perfringens*, Genre *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Enterovirus*: virus de la poliomyélite, virus coxsackie A et B, *Echovirus*, Genre *Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, genre *Giardia*, *Giardia lamblia*, Genre *Legionella*, *Legionella pneumophila*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, Virus de l'hépatite A, *Calicivirus* : Norwalk et  
30 *Sapporo Virus*, *Adenovirus*, *Rotavirus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, Genre *Mycobactéries*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium gordonae*, *Acinetobacter baumanii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Astrovirus*.

- 15/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les microorganismes suivants :
- Escherichia coli, Enterovirus, Genre Cryptosporidium,*
- 5       16/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1, 2 et 4, caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les virus suivants :
- les Adenovirus, Adeno 40, Adeno 41bis ;*
- les Astrovirus, HAstV-1-2 ;*
- 10      17/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1, 2 et 5, 6, caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les parasites suivants :
- Le genre Cryptosporidium, Cryptosporidium parvum, genre Giardia, Giardia lamblia et les Microsporidies.*
- 15      18/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1,2,3 et 6, caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les bactéries suivantes :
- Escherichia coli, Escherichia coli SEROTYPE O157 :H7, genre Salmonella, Pseudomonas aeruginosa, genre Mycobacterium, genre Legionella, Legionella pneumophila, Staphylococcus aureus.*
- 20      19/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1,2 et 4, caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les virus suivants :
- Virus de l'hépatite A, Enterovirus, et au moins un virus choisi parmi les Calicivirus et les Rotavirus.*
- 25      20/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1,2 et 4, caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les virus suivants :
- Virus de l'hépatite A, Enterovirus, et au moins un virus choisi parmi le virus de Norwalk et les Rotavirus.*

21/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1,2 et 5, 6 caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi les parasites suivants :

genre *Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, genre *Giardia*,  
5 *Giardia Lamblia*.

22/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1,2,3 et 6, caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi :

10 *Escherichia coli*, *Escherichia coli* SEROTYPE O157 :H7, genre  
*Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, genre *Mycobacterium*, genre  
*Legionella*, *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus*, Virus de l'hépatite  
A, *Enterovirus*, et au moins un virus choisi parmi les *Calicivirus* et les  
*Rotavirus*, genre *Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, genre *Giardia*,  
*Giardia Lamblia*.

15 23/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1,2,3 et 6, caractérisé en ce que lesdits microorganismes du nécessaire de détermination microbiologique sont choisis parmi :

20 *Escherichia coli*, *Escherichia coli* SEROTYPE O157 :H7, genre  
*Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, genre *Mycobacterium*, genre  
*Legionella*, *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus*, Virus de l'hépatite  
A, *Enterovirus*, et au moins un virus choisi parmi le virus de Norwalk et les  
*Rotavirus*, genre *Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum*, genre *Giardia*,  
*Giardia Lamblia*.

25 24/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les sondes d'identification ont une séquence choisie parmi l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos :1-104, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

30 25/ Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le nécessaire d'identification comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO :1 à SEQ ID NO :39, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO 66 à SEQ ID NO 69 et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence ; au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ

- ID NO:40 à SEQ ID NO:49 , SEQ ID NO:63 à SEQ ID NO:65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence ; et au moins une 5 séquence choisie parmi entre SEQ ID NO:50 à SEQ ID NO:60, SEQ ID NO 70 SEQ ID NO 104 et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.
- 10 26/ Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le nécessaire d'identification comprend au moins quatre sondes d'identification choisies parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO 66 à SEQ ID NO 69 et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites 15 séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.
- 27/ Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que le nécessaire d'identification comprend au moins cinq sondes d'identification choisies parmi SEQ ID NO:50 à SEQ ID NO:60, SEQ ID NO 70 20 SEQ ID NO 104 et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.
- 28/ Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le 25 nécessaire d'identification comprend au moins deux sondes d'identification choisies parmi SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:49 et SEQ ID NO:63 à SEQ ID NO :65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque 30 séquence.
- 29/ Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que le nécessaire d'identification comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO 66 à SEQ ID NO 69 et tous fragments de celles-ci comprenant au 35 moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite

- quelconque séquence, et au moins une séquence comprise SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:63 à SEQ ID NO:65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité 5 avec ladite quelconque séquence.

30/ Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le nécessaire d'identification comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO 66, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 10 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

31/ Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que le nécessaire d'identification comprend au moins une sonde d'identification 15 choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO 66, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

20 32/ Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le nécessaire d'identification comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO 66, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:44, et tous fragments de celles-ci 25 comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

33/ Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que le nécessaire d'identification comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:46 à SEQ ID NO: 49, 30 SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64 et SEQ ID NO :65, et tous fragments de celles- ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

34/ Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que le 35 nécessaire d'identification comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO 66, SEQ ID NO:53 à

SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:70 à SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:44, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

5       **35/** Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que le nécessaire d'identification comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25 à SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:53 à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:61 à SEQ ID NO:75, et tous fragments de celles-ci 10 comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

15       **36/** Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que le nécessaire d'identification comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:9 à SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:14 à SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25 à SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:53 à SEQ ID NO:104, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus 20 dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

25       **37/** Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que le nécessaire d'identification comprend au moins une sonde d'identification choisies parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:9 à SEQ ID NO:55 à SEQ ID NO:104, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque 30 séquence.

35       **38/** Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que le nécessaire d'identification comprend au moins une sonde d'identification choisies parmi SEQ ID NO:14 , SEQ ID NO 62, SEQ ID NO 66 à SEQ ID NO 69, SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 30, SEQ ID NO 9 à SEQ ID NO 11, SEQ ID 23.

35       **39/** Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que le nécessaire d'identification comprend au moins une sonde d'identification choisies parmi SEQ ID NO 59, SEQ ID NO 97, SEQ ID NO 70 à SEQ ID NO 75.

**40/** Procédé selon la revendication 20, caractérisé en ce que le nécessaire d'identification comprend au moins une sonde d'identification choisies parmi SEQ ID NO 98 à 104, SEQ ID NO 59, SEQ ID NO 97, SEQ ID NO 56 à SEQ ID NO 58, SEQ ID NO 76 à SEQ ID NO 96.

5       **41/** Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que le nécessaire d'identification comprend au moins une sonde d'identification choisies parmi SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO 45, SEQ ID NO 65

10      **42/** Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que, préalablement à la mise en contact avec le nécessaire de détermination, on effectue au moins une étape de lyse.

**43/** Procédé selon la revendication 42, caractérisé en ce que, postérieurement à l'étape de lyse, on effectue une étape d'amplification.

15      **44/** Procédé de contrôle selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par la mise en avant traitement du milieu à analyser, d'une étape d'enrichissement en microorganismes du dit échantillon.

**45/** Procédé de contrôle selon la revendication 44, caractérisé en ce que l'étape d'enrichissement est effectuée par filtration.

20      **46/** Procédé de contrôle d'un échantillon liquide selon la revendication 45 , caractérisé en ce que la filtration est conduite en utilisant un moyen de filtration à fibres creuses, utilisé en mode frontal.

25      **47/** Nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon , caractérisé en ce qu'il comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO 66 à SEQ ID NO 69 et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence ; au moins une séquence choisie parmi SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:49 , SEQ ID NO :63 à SEQ ID NO :65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence ; et au moins une séquence choisie parmi SEQ ID NO:50 à SEQ ID NO:60, SEQ ID NO 70 à SEQ ID NO 104 et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

- 48/ Nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon , caractérisé en ce qu'il comprend au moins quatre sondes d'identification choisie parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO 66 à SEQ ID NO 69 et tous 5 fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.
- 49/ Nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon , caractérisé en ce qu'il comprend 10 au moins cinq sondes d'identification choisies parmi SEQ ID NO:50 à SEQ ID NO:60, SEQ ID NO 70 à SEQ ID NO 104 et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.
- 50/ Nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:49, SEQ ID NO :63 à SEQ ID NO :65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque 20 desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.
- 51/ Nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO: 1 à SEQ ID NO:39, SEQ ID NO :61, SEQ ID NO :62, SEQ ID NO 66 à SEQ ID NO 69 et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence, et au moins une sonde 25 d'identification choisie parmi SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:49, SEQ ID NO :63 à SEQ ID NO :65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.
- 52/ Nécessaire de détermination microbiologique d'un 30 microorganisme présent dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID

NO:62, SEQ ID NO 66, SEQ ID NO 68, SEQ ID NO 69, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

5           **54/ Nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO 66,SEQ ID 68, NO SEQ ID 69, NO SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.**

10           **55/ Nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO 66, SEQ ID 68, NO SEQ ID 69, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:44, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.**

15           **56/ Nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO 66,SEQ ID 68, NO SEQ ID 69, SEQ ID NO:53 à SEQ ID NO:55, SEQ ID NO 70 à SEQ ID 75, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:44, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.**

20           **57/ Nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25 à SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:53 à SEQ ID NO:55 SEQ ID NO:61 à SEQ ID NO:75, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.**

- 58/ Nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:9 à SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:14 à SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25 à SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO:53 à SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57 à SEQ ID NO:65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.**
- 10 59/ Nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon , caractérisé en ce qu'il comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:1 à SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:9 à SEQ ID NO:55 à SEQ ID NO:104, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une 15 quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.**
- 20 60/ Nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon , caractérisé en ce qu'il comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14 , SEQ ID NO 62, SEQ ID NO 66 à SEQ ID NO 69, SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 30, SEQ ID NO 9 à SEQ ID NO 11, SEQ ID 23, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.**
- 25 61/ Nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon , caractérisé en ce qu'il comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO 59, SEQ ID NO :60, SEQ ID NO 97, SEQ ID NO 70 à SEQ ID NO 96, SEQ ID NO :98, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 30 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.**
- 35 62/ Nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon , caractérisé en ce qu'il comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO 98 à 104, SEQ ID NO 59, SEQ ID NO 56 à SEQ ID NO 58, SEQ ID NO :60, SEQ ID NO :97,**

SEQ ID NO 70 à SEQ ID NO 96, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

5           **63/ Nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO 45, SEQ ID NO 65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.**

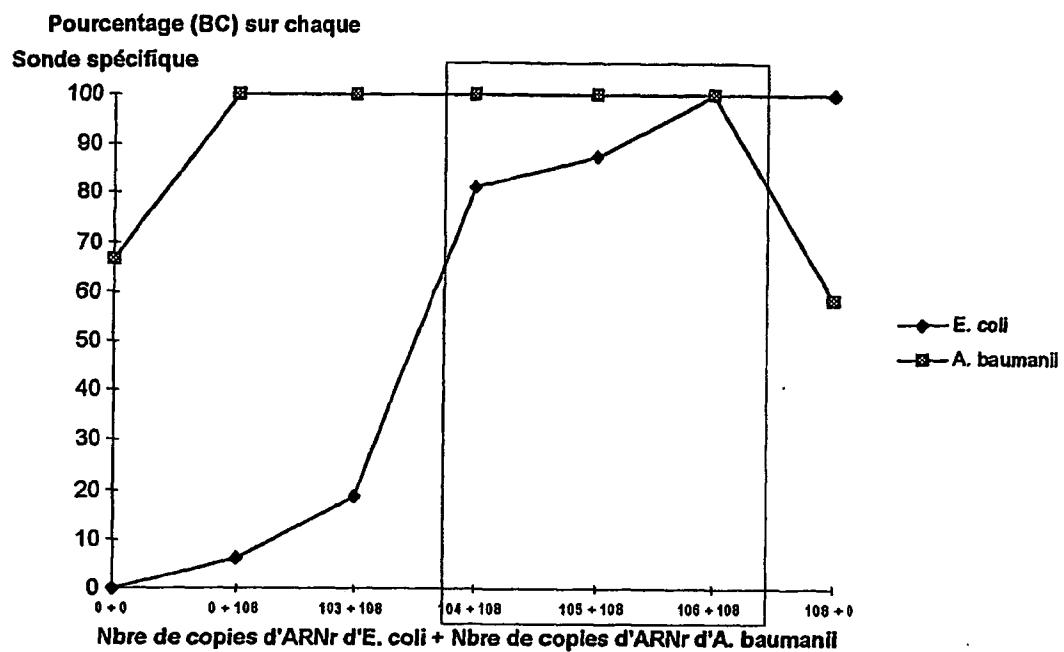
10           **64/ Nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14 , SEQ ID NO 62, SEQ ID NO 66 à SEQ ID NO 69, SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 30, SEQ ID NO 9 à SEQ ID NO 11, SEQ ID 23, SEQ ID NO 59, SEQ ID NO :60 SEQ ID NO 97, SEQ ID NO 70 à SEQ ID NO 96, SEQ ID NO :98 à SEQ ID NO :104, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO 45, SEQ ID NO 65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.**

15           **65/ Nécessaire de détermination microbiologique d'un microorganisme présent dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une sonde d'identification choisie parmi SEQ ID NO:14 , SEQ ID NO 62, SEQ ID NO 66 à SEQ ID NO 69, SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 30, SEQ ID NO 9 à SEQ ID NO 11, SEQ ID 23, SEQ ID NO 98 à 104, SEQ ID NO 59, SEQ ID NO 56 à SEQ ID NO 58, SEQ ID NO :60, SEQID NO :97, SEQ ID NO :70 à SEQ ID NO :75, SEQ ID NO 76 à SEQ ID NO 96, SEQ ID NO:40 à SEQ ID NO 45, SEQ ID NO 65, et tous fragments de celles-ci comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et dont la séquence présente au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.**

20           **66/ Nécessaire de détermination microbiologique selon l'une quelconque des revendications 47 à 64, caractérisé en ce que les sondes d'identifications ou leurs fragments sont fixés sur un support solide.**

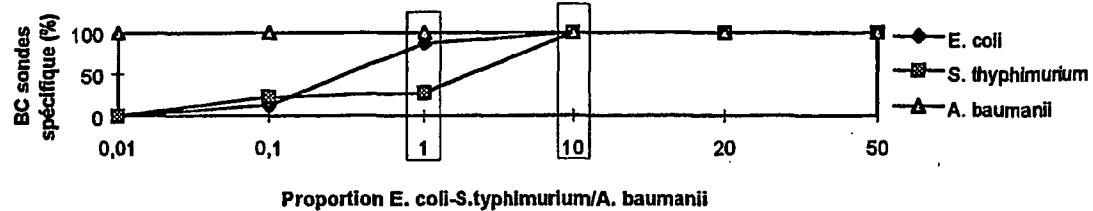
**67/ Nécessaire de détermination -microbiologique selon l'une quelconque des revendications 47 à 65, caractérisé en ce que les sondes d'identification ou leurs fragments sont fixés sur un support solide et constituent une biopuce.**

- 5       **68/ Procédé de production et/ou désinfection d'un liquide, caractérisé en ce qu'il comprend une étape d'analyse mettant en œuvre un nécessaire de détermination microbiologique selon l'une quelconque des revendications de 47 à 67 et générant un algorithme d'interprétation des données permettant l'asservissement dudit procédé de production et/ou**
- 10      **désinfection auxdites données générées par le nécessaire de détermination microbiologique.**

**Figure 1**

**Figure 2**

Pourcentage de bases appelées (BC) des sondes spécifiques de *E. coli*, *S. typhimurium* et *A. baumanii* en fonction des proportion *E.coli-S. typhimurium/A. baumanii*





<400> 5  
gtggttcagc aagttggatg tgaa 24

<210> 6  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 6  
aaactactga gctagagtac ggttagag 27

<210> 7  
<211> 35  
<212> ADN  
<213> Pseudomonas fluorescens

<400> 7  
tgttttgacg ttaccgacag aataaggcacc ggcta 35

<210> 8  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Pseudomonas fluorescens

<400> 8  
tagagtatgg tagagggtgg tggatt 27

<210> 9  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> legionella

<400> 9  
atactgacac tgaggcacga a 21

<210> 10  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Legionella pneumophila

<400> 10  
ttactggcg tcaagggtgc gta 23

<210> 11  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Legionella pneumophila

<400> 11  
ttaacacctaa

<210> 12	
<211> 27	
<212> ADN	
<213> <i>Acinetobacter baumannii</i>	
<400> 12	
gcgttaggcgg cttatatagt cggtatgt	27
<210> 13	
<211> 27	
<212> ADN	
<213> <i>Acinetobacter baumannii</i>	
<400> 13	
cattcgatac tggtgagcta gagtatg	27
<210> 14	
<211> 47	
<212> ADN	
<213> <i>Escherichia Coli Shigella Species</i>	
<400> 14	
cggggaggaa gggagtaaaag ttaataacctt tgctcattga cgttacc	47
<210> 15	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> <i>salmonella</i>	
<400> 15	
gaggaaggta ttgtggtaa ta	22
<210> 16	
<211> 32	
<212> ADN	
<213> <i>Aeromonas caviae</i>	
<400> 16	
cagttagctaa tatctgttgtt ctgtgacgtt ac	32
<210> 17	
<211> 32	
<212> ADN	
<213> <i>Aeromonas hydrophila</i>	
<400> 17	
acgcaggccgg ttggataagt tagatgtgaa ag	32
<210> 18	
<211> 20	
<212> ADN	

<400> 18	
aattgcattt aaaactgtcc	20
<210> 19	
<211> 35	
<212> ADN	
<213> Aeromonas sobria	
<400> 19	
gaaagggtgg cagctaatac ctgtcagctg tgacg	35
<210> 20	
<211> 26	
<212> ADN	
<213> Aeromonas sobria	
<400> 20	
aattgctgtt cagctagagt ctgtgt	26
<210> 21	
<211> 53	
<212> ADN	
<213> Vibrio cholerae	
<400> 21	
cagtagggag gaagggtggtt aagttaatac cttaatcatt tgacgttacc tac	53
<210> 22	
<211> 48	
<212> ADN	
<213> Vibrio cholerae	
<400> 22	
tcaaacctagg aatcgcat tt gaaaactgaca agctagagta ctgtagag	48
<210> 23	
<211> 37	
<212> ADN	
<213> Staphylococcus aureus	
<400> 23	
gttatttaggg aagaacatat gtgttaagtaa ctgtgca	37
<210> 24	
<211> 37	
<212> ADN	
<213> Staphylococcus epidermidis	
<400> 24	
tatttagggaa	

<211> 23	
<212> ADN	
<213> <i>streptococcus bovis streptococcus equinus</i>	
<400> 25	
ttggaaactg ttagacttga gtg	23
<210> 26	
<211> 43	
<212> ADN	
<213> <i>Enterococcus faecalis</i>	
<400> 26	
aagaacaagg acgttagtaa ctgaacgtcc cctgacggta tct	43
<210> 27	
<211> 27	
<212> ADN	
<213> <i>Enterococcus faecium, hirae, durans</i>	
<400> 27	
agagtaactg ttcatccctt gacggta	27
<210> 28	
<211> 29	
<212> ADN	
<213> <i>Clostridium perfringens</i>	
<400> 28	
agcgttaggcg gatgattaag tgggatgtg	29
<210> 29	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> <i>Clostridium perfringens</i>	
<400> 29	
gtgctgcatt ccaaactgggt ta	22
<210> 30	
<211> 24	
<212> ADN	
<213> <i>Mycobacterium sp.</i>	
<400> 30	
gcgtgcgggc gatacgggca gact	24
<210> 31	
<211> 25	
<212> ADN	
<213> <i>Mycobacterium</i>	

aaggtcgggg ttttctcgga ttgac	25
<210> 32	
<211> 29	
<212> ADN	
<213> <i>Mycobacterium kansasii</i>	
<400> 32	
gtccgggttc ttcggattt acggtaggt	29
<210> 33	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> <i>Mycobacterium gordonaee</i>	
<400> 33	
gttttctcgg gctgacggta gg	22
<210> 34	
<211> 24	
<212> ADN	
<213> <i>Mycobacterium marinum</i>	
<400> 34	
aggttcgggt tttctcggat tgac	24
<210> 35	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> <i>Mycobacterium xenopi</i>	
<400> 35	
ctttcagccct cgacgaagct	20
<210> 36	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> <i>Mycobacterium xenopi</i>	
<400> 36	
gtgacggtag gggcagaaga ag	22
<210> 37	
<211> 42	
<212> ADN	
<213> <i>Burkholderia gladioli</i>	
<400> 37	
ccggaaagaa	

<212> ADN	
<213> Burkholderia cepacia	
<400> 38	
actgcattgg tgactggcag gctag	25
<210> 39	
<211> 39	
<212> ADN	
<213> Stenotrophomonas maltophilia	
<400> 39	
gaggaacatc catggcgaag gcagctacct ggaccaaca	39
<210> 40	
<211> 23	
<212> ADN	
<213> Cryptosporidium	
<400> 40	
cagttatagt ttacttgata atc	23
<210> 41	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Cryptosporidium	
<400> 41	
tttagatata aagaaccaat	20
<210> 42	
<211> 27	
<212> ADN	
<213> Cryptosporidium	
<400> 42	
acatatcagc tttagacggtt agggtat	27
<210> 43	
<211> 27	
<212> ADN	
<213> Cryptosporidium	
<400> 43	
tgccttgaat actccagcat ggaataa	27
<210> 44	
<211> 37	
<212> ADN	
<213> Crypt	

<210> 45  
<211> 35  
<212> ADN  
<213> *Cryptosporidium parvum*

<400> 45  
tcattataac agttatagtt tacttgataa tcttt 35

<210> 46  
<211> 43  
<212> ADN  
<213> *Cryptosporidium parvum*

<400> 46  
attggaatga gttaagtata aacccttta caagtatcaa ttg 43

<210> 47  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> *Cryptosporidium parvum*

<400> 47  
tagttggatt tctgttaata atttatata 29

<210> 48  
<211> 36  
<212> ADN  
<213> *Cryptosporidium parvum*

<400> 48  
atatttatat aatattaaca taattcatat tactat 36

<210> 49  
<211> 41  
<212> ADN  
<213> *Cryptosporidium parvum*

<400> 49  
tttcgaagga aatgggtaat cttttgaata tgcatcgta t 41

<210> 50  
<211> 382  
<212> ADN  
<213> Adenovirus 40 (L19443)

<400> 50  
ctaaaggaa  
ctaaccctgtg )  
cgccgcacct )  
actcatcata )

aatcatatta ggttatatcc ag	382
<210> 51	
<211> 382	
<212> ADN	
<213> Adenovirus 41 bis (M18289)	
<400> 51	
ctgaaggaa ctgcagtgt taagcataat atgatttgt gcactggta ctctcagctg 60	
ctaacttgcg cagatggaaa ctgtcagact ctaaaagtga ttcatgtggt ttccccatca 120	
cgcgcgcctt ggcctgttt tgtagcataac atgcttatgc gttgtaccat gcatttgggg 180	
gctcgctgt gcacatgtttc tccatatacg agtaattttt gccatactaa agttttaaatg 240	
gaaactgatg cttttcgcg ggtgtgggtt agcgggggtt ttgatttgac catagagctg 300	
tataaagtgg tgagatatga tgagttaaag gtcgttgcg gcccctgtga gtgtggagcc 360	
aatcacatca ggttatatcc ag	382
<210> 52	
<211> 67	
<212> ADN	
<213> Astrovirus HAstV-1-2 (L23513)	
<400> 52	
agggtacagc ttccttcttt tctgtctctg ttttagattat tttaatcacc atttaaaattt 60	
gatttaa	67
<210> 53	
<211> 521	
<212> ADN	
<213> Poliovirus (X00595)	
<400> 53	
cgttacctt gtgcgcctgt tttatactcc cttcccgcaa cttagaagca cgaaacccaag 60	
ttcaatagaa ggggtacaa accagtacca ctacgaacaa gcacttctgt ttccccgggt 120	
acattgcata gactgctcac gcgggtgaaa gtgatcgatc cggttacccgc ttgtgtactt 180	
cgaaaaagct agtatgcctt tggaatcttc gacgcgttgc gctcagcacc cgaccccggt 240	
gtgtggctta ggctgtatgag tctggacatt cctcaccgggt gacgtggtc taggctgcgt 300	
tggcggccta cctatggcta acgccccatagg acgttagatg tgaacaagggt gtgaagagcc 360	
tattgagcta cataagatgc ctccggccccc tgaatgcggc taatcttaac cacggaacag 420	
gcggtcgcga accagtgact ggctgtcgta aacgcgcgaag tctgtggcg aaccgactac 480	
tttgggtgtc cgtgtttccctt gttatTTTA tcattggctgc t	521
<210> 54	
<211> 520	
<212> ADN	
<213> Coxsackievirus (D00538)	
<400> 54	
aggtaacctt gtacgcctgt tttatataccc ttccccggta actttagaag cttatcaaaa 60	
gttcaatagc aggggtacaa gccagtagctt ctacgaacaa gcacttctgt ttccccgggt 120	
aaatcatata	0
cgagaagcct	0
tgttagcttag	0
aaaaaaaaatcac	0

ttgggtgtcc gtgttccct ttatattcat actggctgct 520

<210> 55  
<211> 525  
<212> ADN  
<213> Echovirus (X77708)

```

<400> 55
cggtacctt gtgcgcctgt tttatatacc ctccccctag taacctagaa gttcatcaca 60
aatgatcaat agtagtctca acaaaccagt tgagccctaga tcaaggactt ctgttacccc 120
gggctgagta tcaataagct gttgacacgg ctgaaggaga aaacccccgt taccggacca 180
gtctacttcgg agaacctagt atcaccatag aggttgcgtt gcgttgcgtt ccgcacaacc 240
ccagtgtaga tcaggtcgat gagtcaccgc gttccccaca ggccactgtg gcgggtggctg 300
cgttggcgcc ctgccccatgg ggttaccat gggacgcttc aatactgaca tggtgtgaaag 360
agttgactga gctagctggt agtcctccgg cccctgaatg cggtctaatcc taactgtgaa 420
gcaagtggcc acaaccagt ggttggcttg tcgttaatggg caactctgca gccggaaaccga 480
ctactttggg tgaccgtgtt tctctttatt ctatattgg ctgtt 525

```

<210> 56  
<211> 981  
<212> ADN  
<213> Rotavirus U36242

```

<400> 56
atgtatggta ttgaatatac cacaattctg accatttga tatttatcat attattgaat 60
tatatatattaa aaactataac taatacgatg gactatatag tttttaaatt tttgctacta 120
atcgctctga tgtcaccatt tctaaggacg caaaattatg gcatgtatTTT accaataaca 180
ggatcaactag acgctgtata cacaattca actagtggag aatcatttct aacttcaacg 240
ctatgtttat actatccaac agaagctaaa aatgagattt cagataatga atggaaaaat 300
actctatcag aattatTTT aactaaagga tggccggctg gatcaatTTT ttttaaagac 360
tacaatgata ttactacat ttctatgatTTT ccacaactgtt attgtgatTTT taatgtatga 420
ttgatgagat atgataatac atctgaatta gatgcattcg agttacgaga tcTTTatTTT 480
aacaaatggc tgtgcattcc tatggatTTT tcactttactt attatcaaa aaatagcgaa 540
tcaaaataat ggatataat cggAACAGAC tgtacggtaa aagtttgtcc actcaataca 600
caaactctag gaattggatg caaaactacg gacgtggat catTTTgatTTT tggcgtcg 660
tctgaaaaat tggtaattac tgatgttgta aatggtgtaa accataaaat aataatTTTca 720
ataagtacat gtactatac taattgtatTTT aaacttaggac cacgagaaaa tggcgtata 780
attcaagttg gtggaccgaa cgcaactagat atcaactgtg atccaacaac agttccacag 840
gttcaaaagaa ttatgcgagt aaattggaaa aatggtgcc aagtgtttta tacagtagtt 900
gactatattt accaaattat acaagttatg tccaaacggtt caagatcatt agacacagct 960
gttttttattt atagaattta g 981

```

<210> 57  
<211> 981  
<212> ADN  
<213> Rotavirus M86834

```
<400> 57
atgtatggta ttgaatatac cacagttcta ttttatttga tatcggtcg tcttgtgagt 60
tacattttaa aaaccataac gaaaatgtat gactatatta tttatagagt aacttttata 120
attgttgat tatcgatctt ctctatccca cccatattttt ccattttttt ccattttttt 180
ggatctatgg 0
ctatgtctat 0
acatttatctc 0
```

aatgaatgg tttgttaatcc aatggatata acgctatatg attatcaaca aactggagaa 540  
 gcaaaaaat ggatatcaat gggatcatct ttgtactgtca aagtgtccc attaaatacg 600  
 caaactttag gaattggctg ccaaacaacg aatgttagcta cttttgaat ggtggctgac 660  
 agtggaaaac tagcgatagt tgatgttggataatgtaa atcataaatt agatattaca 720  
 tctacaacgt gtacaatacg aaattgttaag aaatttagtc caagagaaaa tttgtggctata 780  
 atacagggttgcgttataactagat ataacggctg atcccacgac ttcaccgca 840  
 acggaaacaa tgatgttgcgttataattggaaag aaatggtggc aagtatttttta cactgttagtt 900  
 gattatatta atcagatagt acaaatacg tccaaaagat cgaggtcgct agattcatcc 960  
 tcttttatt atagagtata g 981

<210> 58  
<211> 981  
<212> ADN  
<213> Rotavirus U26395

<400> 58  
 atgtatggta ttgaatatac cacaattctta atctttctga tatcaatcat cttactcaac 60  
 tataatattaa aatcaatgtac ccgaataatg gactacatata tataatgatt tttatataatt 120  
 tctgttagcat tattttgcctt aactaaatgt cagaactatg gacttaatata accaataaca 180  
 ggatcaatgg acactgttta ctccaactct actcaagaag gaatatttctt aacatccaca 240  
 ttatgtttgttattatccaac tgaagcaagt actcaaatca gtgtatgtga ttggaaagac 300  
 tcattatcac aatgtttctt tacaatggatgg tggccaacacg gatcgtctt ttttaaagag 360  
 tactcaataa ttgttgactt ttccgttgat ccacaattat attgtgatta taacttagta 420  
 ctaatgaatgt atgatcaaaa tcttgaacta gatatgtcag aatggatctga tttgatattt 480  
 aatgaatggc tatgtatcc aatggatata acattatattt attatcaaca atcgggagaa 540  
 tcaatataatggatcatca tttgtatgtga aatgtgttcc actgaataca 600  
 caaacgttag gaatagggtt tcaaacaacg aatgttagact catttggaaac ggttgctgaa 660  
 aatggaaaat tagctatagt ggatgtcggtt gatggatca atcataaaat aaatttgaca 720  
 actacgacat gtactattcg aaattgttaag aatggatgtc caagagatgt tttgtatgt 780  
 atacaatgttgcgttataatttttgcgttataatccacaa atacagcggttcc acggatcc 840  
 attggatgttgcgttataatttttgcgttataatccacaa atacagcggttcc acggatcc 900  
 gattatatta atcagatgttgcgttataatttttgcgttataatccacaa atacagcggttcc acggatcc 960  
 gcttttttttatt atagagtata g 981

<210> 59  
<211> 398  
<212> ADN  
<213> Virus de Norwalk (M87661)

<400> 59  
 ataaaatgttgcgttataatccacaa atacagcggttcc acggatcc 60  
 tataagaatc attttgatgc agattatataca gcatggactt caacacaaaa tagacaaaatt 120  
 atgacagatgttgcgttataatccacaa atacagcggttcc acggatcc 180  
 gtggcccaag atttgttgcgttataatccacaa atacagcggttcc acggatcc 240  
 aaagaggggc tgccatctgg atttccatgttgcgttataatccacaa atacagcggttcc acggatcc 300  
 ataattactt tctgtgcact gtttgcgttataatccacaa atacagcggttcc acggatcc 360  
 atgtcatatt ttcatttttgcgttataatccacaa atacagcggttcc acggatcc 398

<210> 60  
<211> 247  
<212> ADN  
<213> Hepat

<400> 60

ccatgaaaga tttgaaagga aaagctaaca gagggaaaat ggatgttca ggagtacaag 180  
cacctgtggg agctatcaca acaattgagg atccagttt agcaaagaaa gtacctgaga 240  
catttcc 247

<210> 61  
<211> 54  
<212> ADN  
<213> Enterococcus faecalis

<400> 61  
tctcaatcac tggacgtggt actgttgcta caggacgtgt tgaacgtggt gaag 54

<210> 62  
<211> 53  
<212> ADN  
<213> Escherichia coli

<400> 62  
tctccatctc cggtcgtggt accgttgtta ccggtcgtgt agaacgcggt atc 53

<210> 63  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Cryptosporidium parvum

<400> 63  
tcctacgtct aacttcacgt g 21

<210> 64  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Cryptosporidium parvum

<400> 64  
tgtgattggtaaaaaagtata g 21

<210> 65  
<211> 164  
<212> ADN  
<213> Giardia lamblia

<400> 65  
ggaatgtctt gtagggcccc gcacccacccg cgccgcggat gcgtccctgc cccttgtaca 60  
caccggccgt cgctctacc gactggggcgc gggggggagc gcacccggacg cgcgaaaggc 120  
cgcgagcccc cgccgcctgga ggaaggagaa gtcgttaacaa ggtt 164

<210> 66  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Esche

<210> 67  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Enterococcus faecalis

<400> 67  
actgaacgtc ccctgacggt atct 24

<210> 68  
<211> 51  
<212> ADN  
<213> Escherichia coli O157 :H7

<400> 68  
tggatcgca aaactgtgga atttagcagc gttgggtggaa aagcgcgtta c 51

<210> 69  
<211> 81  
<212> ADN  
<213> Escherichia coli O157 :H7

<400> 69  
tgtgggcatt cagtctggat cgcgaaaaact gtggaaattga gcagcggtgg tggaaaggcg 60  
cgttacaaga aagccggca a 81

<210> 70  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Poliovirus type 2

<400> 70  
ctccggcccc tgaatgcggc taatcctaac 30

<210> 71  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Poliovirus type 2

<400> 71  
accagtgact ggcttgcgt 20

<210> 72  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Coxsackievirus A21

<400> 72  
tcggggccct

<212> ADN  
<213> Coxsackievirus A21

<400> 73  
ccagttagta ggttgtcgta

20

<210> 74  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Echovirus 12

<400> 74  
agtccctccgg cccctgaatg cggttaatcc

30

<210> 75  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Echovirus 12

<400> 75  
acaacccagt gggtggcttg

20

<210> 76  
<211> 1061  
<212> ADN  
<213> Rotavirus

<400> 76  
ggcttttaaa gagagaattt ccgtttggct agcggttagc tccttttaat gtatggtatt 60  
gaatatacca caattctaac ctttctgata tcaatagttt tattgaacta tatattaaaa 120  
tcactaacta gtgcgtatggc ctttataatt tatagatttc ttttacttat tgttattgca 180  
tcaccttttgc ttaaaaacaca aaattatggc attaatttac cgatcactgg ctccatggat 240  
acagcatatg caaattcatac acagcaagaa acattttgc cttcaacgct atgcttataat 300  
tacccatcag aagcgtaaac tcaaattggc gatacagaat ggaaggatac tctgtcccaa 360  
ttattcttgc ctaaagggtg gccaactggc tcagtcattt ttaaagaata caccgatatac 420  
gtttcatttc caatttgcatttgc gcaactttat tgggattata atgttgtact gatgaagtat 480  
gattcaacgt tagagctaga tatgtctgaa ttagctgatt taattctaaa tgaatggta 540  
tgtaacccaa tggatataac attatattat tatcagccaa cagatgaagc gaataaatgg 600  
atatcgatgg gacagtcttgc taccataaaa gtatgtccat tgaatacgca gacttttagga 660  
atagggtgttgc ttaccacaaa tacagcgaca tttgaagagg tggctacaag tggaaaaatta 720  
gtaataacgg atgttgttgc tgggtgtgaaac cataaaacttg atgtgactac aaataccctgt 780  
acaattagga attgttgcatttgc gttgggacca agagaaaatg tagcgatttatac acaagtcgg 840  
ggctcagatgg tggatagat taccggat ccaactactg caccacaaac tgaacgtatg 900  
atgcgatggaa attggaaagaa atgggtggcaat gttttctata cagtagttaga ttatattaaat 960  
cagattgtgc aagttatgtc caaaagatca cggtcattaa attcagcagc tttttactat 1020  
agggtttgtat atatcttgc ttagaattgt atgatgtgac c 1061

<210> 77  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Rota

<400> 77

<210> 78  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Rotavirus

<400> 78  
aatacatctg aatttagatgc a

21

<210> 79  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Rotavirus

<400> 79  
caaacaaatg gatatcaat

19

<210> 80  
<211> 45  
<212> ADN  
<213> Rotavirus

<400> 80  
ggttcaaaga attatgcgag taaattggaa aaaatggtgg caagt

45

<210> 81  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Rotavirus

<400> 81  
ctttttatta tagaatttag

20

<210> 82  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Rotavirus

<400> 82  
tttagaggt aactttata attgttgtat

30

<210> 83  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Rotavirus

<400> 83  
tctggagagg agttggat a

21

<210> 84  
<211> 19

<400> 84 caaataaatg gatatcaat	19
<210> 85 <211> 45 <212> ADN <213> Rotavirus	
<400> 85 aacggAACGA atgatgcgtg ttaattggaa gaaatggtgg caagt	45
<210> 86 <211> 20 <212> ADN <213> Rotavirus	
<400> 86 ctttttatta tagagtagat	20
<210> 87 <211> 30 <212> ADN <213> Rotavirus	
<400> 87 tatataGATT ttTATTAATT TCTGTAGCAT	30
<210> 88 <211> 21 <212> ADN <213> Rotavirus	
<400> 88 caaaatcttg aactagatAT g	21
<210> 89 <211> 19 <212> ADN <213> Rotavirus	
<400> 89 caaataAGTG gatatcaat	19
<210> 90 <211> 45 <212> ADN <213> Rotavirus	
<400> 90 aattGAGAGA	;

<210> 91  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Rotavirus

<400> 91  
cttttattta tagagtatag

20

<210> 92  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Rotavirus

<400> 92  
tttatagatt tcttttactt attgttattg

30

<210> 93  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Rotavirus

<400> 93  
tcaacgttag agctagatat g

21

<210> 94  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Rotavirus

<400> 94  
cgaataaatg gatatcgat

19

<210> 95  
<211> 45  
<212> ADN  
<213> Rotavirus

<400> 95  
aactgaacgt atgatgcgag taaattggaa gaaatggtgg caagt

45

<210> 96  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Rotavirus

<400> 96  
cttttacta tagggttgta

20

<210> 97  
<211> 64  
<212> ADN

<400> 97  
atggatgttt caggagtaca agcacctgtg ggagcttatca caacaattga ggatccagtt 60  
tttag 64

<210> 98  
<211> 551  
<212> ADN  
<213> Sapporo Virus

```

<400> 98
tgtatgtctg ccaccacgct tatagccacc gggcgttta aggccgtggc taccaggcta 60
cagggtgtga cacaatgac accagttgtc gtggcatta acatggactc tgtcagatg 120
caagtgtatga atgactctt aaaggggggt gttcttact gtttgattta ttccaaatgg 180
gattccacac aaaacctgc agtgacagca gcctccctgg caatattgga gagatttgct 240
gagccccatc caatttgtc ttgtgccatt gaggcttti cctccctgc agaggctat 300
gtcaatgata tcaaatttgc gacacgcggc ggcctaccat ctgggatgcc attacatct 360
gtcgtaata ctatcaacca tatgatatac gtggggcag ccatccgtca ggcatacggaa 420
agcccaaatg tccccatatac tgaaaacgtc ttccaagtgg agaccgttca cacgtatggt 480
gtgattgtca tgtacagcgt gtgccttgcc actgcatcaa tttccacac tgcgttgc 540
aacctaactc 551

```

<210> 99  
<211> 382  
<212> ADN  
<213> Southampton Virus

<210> 100  
<211> 312  
<212> ADN  
<213> Desert Shield virus

```
<400> 100
tttgcgttattacacggcctgggattccactcaaacaaggaaatcatgatggagtcc 60
tttaacatcatgttaaactcaactgccaacctttccctggctgcggtagtggcacaagac 120
ttactttctcttctgaaaatggatgttggagattatgttaatcagtgtaaaagacggctg 180
ccatcaggctccccgtgtacctcacaagtcAACAGCATAAATCAGTGGATTCACCCCTG 240
tgtgcatttgcagaagtacccggctctccccagatgtgttgtcagtcacagtcgatttt 300
tccttctatgg 312
```

<210> 101  
<211> 362  
<212> ADN  
<213> Toronto Virus

<400> 101  
aatgaagatg gtcccaataat atttgagaaaa cattccagat acagatacca ctatgtatc 60

gattactccc gctgggactc cacgcagcag cgggcagtgc tggcagcagc acttgaaatc 120  
atggtaggt tctctgctga accacagcta gcacaaatag tagctgaaga cctgctagca 180  
ccaagtgtgg ttgatgtggg tgacttcaag atcaccatta atgaaggcct accttctgg 240  
gtgccttgc a ctcacagtg gaactccatt gcccaactggt tgcttactct gtgtgccctt 300  
tctgaagttt caggactagg cccccgacatc atacaagcta attctatgtt ctctttctat 360  
gg 362

<210> 102  
<211> 364  
<212> ADN  
<213> Snow Mountain Virus

<400> 102  
tgaatgagga tggacccata atttttgaaa agcactccag gttctcatac cactatgatg 60  
cagattactc acgctggac tcaacccaaac agagggcagt gctagctgca gccttgaaaa 120  
tcatggtaaa attctcacca gaaccacatt tggcccaat tggatggcagag gatctccatg 180  
cccccagtgt gatggatgtt ggtgatttca aaataacaat taatgaggga ctgcctcg 240  
gagtacctg cacatcacag tggatttca tcgcccactg gctctcaca ctctgtgcac 300  
tatctgaagt cacaaacctg gctctgaca tcataacaagc taactcctt 360  
atgg 364

<210> 103  
<211> 376  
<212> ADN  
<213> Hawaii Virus

<400> 103  
tcagagttgg tatgaacatg aatgaggatg gccccattat ctttgagaaa cactccaggt 60  
ataaaatatca ttaagattat tctcgatggg actcaacaca gcagagagcc gtactagctg 120  
cagccctaga gatcatggtc aaattctccc cagagccaca cttggcccgat gtagttgcag 180  
aagaccttctt ttccccccatg gtatggatg tgggtgactt caagatatca atcaacgagg 240  
gtctccctctc tgggtgccc tgcacctcgc aatggaactc catcaccacatc tgctccatca 300  
ctctttgtgc actctctgaa gtcacggacc tggatggatc catcattcaa gccaattctt 360  
tattctcttt ctatgg 376

<210> 104  
<211> 382  
<212> ADN  
<213> Bristol Virus

<400> 104  
tcagagttgg catgaatatg aatgaggatg gccccatcat cttcgagaga cactccagat 60  
acaagtatca cttatgtatc gactactctc ggtgggattc aacacaacaa aggccgtgt 120  
tagcagcagc ccttagaaatc atggatggat tctccccaga accgcatttgc gcccagatag 180  
ttgcagaaga ctttctatct ctttagtgc tggatgtggg tgacttcaaa atatcaatca 240  
atgagggcct tccctctgggt gtgcctgca cctctcaatg gaattccatc gcccactggc 300  
tcctcactc ctgtgcactc tctgaagttt cttttttttt ccctgacatc atacaggcta 360  
atccctcttt ttcctctat gg 382